

1

明細書

抗血小板膜糖蛋白質VIモノクローナル抗体

5

技術分野

本発明は、ヒト血小板膜糖蛋白質 VI（以下、GPVI と略称することがある）に対する抗体および該抗体を産生する細胞に関するものである。

背景技術

10 血小板は血液凝固・生体防御において極めて重要な役割を担っており、生理的な役割から種々の病態における関わりが解明されつつある。特に、血小板は止血血栓を形成するという機能においても注目されており、例えば、血管内皮細胞が損傷を受けると、血管内皮下の主要なマトリックス蛋白質であるコラーゲンが露出し、ここへ血小板が粘着する。次に、コラーゲンからのシグナルにより血小板
15 が活性化され、最終的にはフィブリンノーゲンを介して血小板が凝集する。そして場合によってはこれが血栓塞栓性疾患のような病的状態の原因となることから治療の標的として注目されている。

従来、血小板凝集に基づく血栓症の治療・予防の目的で、アスピリン、チクロピジン、GPIIb/IIIa アンタゴニスト等の抗血小板薬が用いられてきたが、
20 有効性および出血等の副作用の面から多くの問題が指摘されており、これらの問題の無い、十分な安全性、および確実かつ適切な作用を有する優れた抗血小板薬の登場が望まれている。

血小板膜上に存在するGPVIは、血小板のコラーゲン受容体であり、コラーゲン刺激による血小板の活性化に中心的役割を担っていることが明らかにされている
25 （非特許文献1：高山博史，日本血栓止血学会誌，2003年，第14巻，第2号，p. 75－81参照）。すなわち、スギヤマらは自己免疫性血小板減少患者の血小板では62kDaの膜蛋白質が特異的に欠損しており、コラーゲンによる血小板凝集が認められないこと（非特許文献2：タテオ・スギヤマ（Tateo Sugiyama）、外5名，ブラッド（Blood），（米国），1987年，第69巻，

第6号, p. 1712-1720参照)、さらに、この患者の血小板で欠損していた蛋白がGPVIであり、患者の血清より精製した抗体のFab断片がコラーゲン惹起血小板凝集を抑制することを報告している(非特許文献2および非特許文献3: マサアキ・モロイ (Masaaki Moroi)、外3名, ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation), (米国), 1989年, 第84巻, 第5号, p. 1440-1445参照)。

これまでに自己免疫疾患患者由来の抗ヒトGPVI自己抗体は、スギヤマら(非特許文献2参照)やタカハシら(非特許文献4参照)が報告している。しかしながら、スギヤマらの報告では患者血漿を精製した抗ヒトGPVI自己抗体には血小板凝集を惹起する作用があり、直ちに医薬応用はできない。非特許文献4(ホウユウ・タカハシ (Hoyu Takahashi)、外1名, アメリカン・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (American Journal of Hematology), (米国), 2001年, 第67巻, 第4号, p. 262-267)には、GPVIと推測される約62kDaの蛋白に対する自己抗体の存在、及び、この抗体が血小板凝集を惹起することが記載されている。また、これらの患者由来の抗GPVI抗体を医薬として臨床応用するためには安全性の高い抗体を安定した品質で大量に生産する必要があるが、工業的に生産する方法は未だ確立されていない。

現在までに作製されている抗GPVI抗体として、マウスGPVIに対するモノクローナルラット抗体(特許文献1: 欧州特許出願公開公報第1228768号参照)、およびヒトGPVIに対するモノクローナルマウス抗体がある(特許文献2: 国際特許出願公開公報第01/00810号および特許文献3: 国際特許出願公開公報第02/080968号参照、Thromb Haemost. 2003 Jun;89(6):996-1003)。

これらは、非ヒト動物由来の抗体であり、ヒトに投与した場合、高度な免疫原性(「抗原性」という場合もある)を有するために副作用が危惧され、該抗体をそのままヒトに投与することは不適當であり、ヒトに投与する抗体は純粹にヒト由来のヒト抗体であることが求められている。

また、ヒトGPVIを認識するヒト一本鎖抗体(scFv: single chain Fv)がファージディスプレイ法等を用いて作製されている(特許文献2、特許文献3、および非特許文献5: ピーター・A・スメサースト (Peter A Smethurst)、外15

名、ブラッド (Blood) , (米国) , 2002年, 第100巻, 第11号, p. 474a参照)。これらの一本鎖抗体はヒト抗体のVHとVLをペプチドリンカーで結合させたものであり、ヒト由来の変換領域を有する抗体であるが、細胞が産生する通常のイムノグロブリンに比べると、一般的に抗原への親和性が低く、

5 生体内での半減期も短い。

CDR (相補性決定領域) 移植等によるヒト化抗体の作製方法は公知であるが、CDRのアミノ酸配列および多くの場合にはフレームワーク領域 (FR) の一部が非ヒト動物抗体由来であり、抗体のアミノ酸配列のすべてがヒト由来ではないために、投与した抗体に対する抗体が生体内で産生される可能性が指摘されており、免疫原性の面から医薬として有効でかつ安全なものとは言えない。ヒト抗体

10 の作製について複数の報告があるが、いずれの報告の方法も種々の問題点を有し、あらゆる抗原に適用可能な一般化された方法であるとは認識されていないのが現状であり、一般的に高力価のヒト抗体を取得することは困難である。

15 発明の開示

このように抗血小板薬として、安全性が高く、有効性が優れ、かつ使いやすい薬剤が求められている状況において、ヒトに投与可能な、純粋にヒト由来の抗GPVI抗体が切望されている。

本発明の目的は、ヒト血小板膜上に存在する糖蛋白質である GPVI に特異的に結合する新規な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を提供するものである。特にヒトに投与可能で、有効でかつ副作用の点で問題のない、純粋にヒト由来である抗 GPVI ヒト抗体を提供するものである。また、ヒト GPVI に特異的に結合し新規なCDR配列を含有する抗体を提供するものである。

20

さらに、これらの抗体を産生する細胞、具体的には特定のハイブリドーマを提供するものである。

25

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、GPVI に対する自己抗体を産生するヒトのリンパ球を出発材料として、GPVI を介する血小板凝集を効果的に抑制するヒト抗体の取得を着想した。この着想に基づき、鋭意研究を重ねた結果、末梢血リンパ球を特定の条件の体外免疫法 (in vitro immunization) で活性化し、

マウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製したところ、複数のハイブリドーマから、GPVI との結合能を有し、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する活性を有する抗体を産生するハイブリドーマを得ることに成功した。そして、当該クローンを単離し、さらに検討を重ねた結果、該抗体をコードする遺伝子を得ることに成功し、この抗体のCDRのアミノ酸配列が新規の配列であることを明らかにした。さらに、遺伝子組換え技術により組換え抗体を作製し、本発明を完成した。

なお、本明細書においては、ハイブリドーマ（例えば、クローン# 2-6）が産生する抗体を# 2-6 抗体と、また、該ハイブリドーマの抗体遺伝子から遺伝子工学的に組み換えた抗体を R# 2-6 抗体のように記載することがある。

10 本発明の第1の態様は、ヒトGPVI に特異的に結合するヒト抗体、好ましくはモノクローナル抗体（以下抗ヒトGPVI 抗体及びヒトGPVI モノクローナルヒト抗体と各々記載することがある）またはその活性断片であり、好ましくは、単独ではヒト血小板凝集を惹起しない抗体またはその活性断片である。具体的には、

15 (1) ヒトGPVI と特異的に結合し、生体内に投与することでコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制するヒト抗体またはその活性断片で、好ましくは、該抗体または活性断片を生体内へ投与した後に血液中より単離した血小板について、コラーゲンにより惹起される凝集能が通常の血小板に比べて低下あるいは認められないもの、

20 (2) ヒトGPVI と特異的に結合し、血小板上のGPVI とコラーゲンとの結合を特異的に阻害する、血小板上の機能的なGPVI を消失させる、あるいは、予めヒト血小板と接触させることによりコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する、すなわち、ヒト血小板がコラーゲンに応答して凝集する能力を低下もしくは欠如させる、いずれか一つ以上の作用を持つヒト抗体またはその活性断片、

25 (3) 血小板上のヒトGPVI を該血小板の細胞内に取り込ませる(internalize)、もしくは、切断することによりコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する、前記(1)ないし(2)の抗体またはその活性断片である。

前記(1)ないし(3)の抗体は、単独ではヒト血小板凝集を惹起しない、及び/または、生体内に投与した場合、血小板減少を引き起こさない抗体が好まし

い。好適な例として、クローン# 2-6または# 2-4のハイブリドーマが産生する抗体またはそれをヒトIgG、より好ましくはヒトIgG4に組み替えた抗体が挙げられる。また、本発明の抗体は、ヒトGPVIと抗体との解離定数(K_d値)が好ましくは100nM以下、より好ましくは50nM以下の抗体である。

- 5 本発明の抗体の活性断片とは、GPVIとの結合能を有する限りにおいて、例えば、Fab (Fragment of antigen binding)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化抗体(dsFv)、CDRを含むペプチド等である。

また、具体的には、

- 10 (4) ヒトGPVIに特異的に結合し、コラーゲンによるヒト血小板の凝集を特異的に抑制するがトロンビンによる凝集は抑制せず、単独ではヒト血小板凝集を惹起しないヒト抗体またはその活性断片である。該抗体は、コラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する濃度または用量と同等、好ましくは10倍、より好ましくは100倍、さらに好ましくは1000倍において、単独ではヒト血小板凝集を有意に惹起しない抗体またはその活性断片である。

- 15 ここで前記(1)ないし(4)の抗体のうち、ヒトGPVIとコラーゲンとの結合を阻害する抗体は、好ましくは10nM以下、より好ましくは1nM以下、さらに好ましくは0.1nM以下の解離定数(K_d値)でヒトGPVIとコラーゲンとの結合を阻害する抗体である。

- 20 本発明の抗体は必ずしも特定のクローンに限定されるものではなく、本発明の好ましい例(# 2-6、# 2-4、R # 2-6またはR # 2-4抗体等)と同様の作用を有する抗体は本発明の範囲に包含される。本発明の抗体の作用の有無は実施例に示される方法または公知の方法によって確認し得る。

- 25 また、本発明の好ましい抗体とGPVI上の結合部位もしくはエピトープが同一か少なくとも部分的に共通である抗体、例えば、GPVIとの結合において互いに競合する関係にある抗体は本発明の範囲に包含される。本発明の抗体との結合部位の共通性の有無は実施例に記載の方法に準じて、または公知の方法によって確認し得る。

本発明の第2の態様は、新規なCDRアミノ酸配列または可変領域アミノ酸配列を含有する抗ヒトGPVI抗体であり、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、

(5) 少なくとも抗体のH鎖またはL鎖の一方の3組のCDR、好ましくは抗体のH鎖およびL鎖両方の6組のCDRが、表4に記載のクローン、好ましくはクローン#2-6および#2-4からなる群から選択される何れかのハイブリドーマが産生する抗体のCDRのアミノ酸配列を、それぞれ対応するCDRのアミノ酸配列として含有する抗ヒトGPVI抗体またはその活性断片、

(6) 配列番号47のアミノ酸配列をVH CDR1に、配列番号48のアミノ酸配列をVH CDR2に、配列番号49のアミノ酸配列をVHCDR3に、配列番号98のアミノ酸配列をVLCDR1に、配列番号99のアミノ酸配列をVLCDR2に、配列番号100のアミノ酸配列をVLCDR3に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、または配列番号7のアミノ酸配列をVH CDR1に、配列番号8のアミノ酸配列をVH CDR2に、配列番号9のアミノ酸配列をVHCDR3に、配列番号10のアミノ酸配列をVLCDR1に、配列番号11のアミノ酸配列をVLCDR2に、配列番号12のアミノ酸配列をVLCDR3に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、

(7) 少なくとも抗体のH鎖またはL鎖の可変領域、好ましくは抗体のH鎖およびL鎖両方の可変領域が、表4に記載のクローン、好ましくはクローン#2-6および#2-4からなる群から選択される何れかのハイブリドーマが産生する抗体が有する可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ対応する可変領域のアミノ酸配列として含有するヒトGPVI抗体またはその活性断片、

(8) 配列番号143のアミノ酸配列をH鎖の可変領域に、配列番号144のアミノ酸配列をL鎖の可変領域に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、または配列番号15のアミノ酸配列をH鎖の可変領域に、配列番号16のアミノ酸配列をL鎖の可変領域に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、

(9) #2-6細胞または#2-4細胞が産生するモノクローナル抗体またはその活性断片である。

本発明の第3の態様は、第1または第2の態様の抗体を産生する細胞である。
具体的には、

(10) 前記(1)ないし(9)に記載のいずれかの抗体を産生する形質転換

細胞、

(11) #2-6細胞または#2-4細胞である、前記(10)記載の細胞である。

本発明の第4の態様は、第1または第2の態様の抗体またはその活性断片の少なくともH鎖またはL鎖の一方の3組のCDR好ましくは可変領域をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたは核酸である。具体的には、第1または第2の態様の抗体またはその活性断片をコードするポリヌクレオチドであって、

(12) 少なくとも抗体のH鎖またはL鎖の一方の3組のCDR、好ましくは抗体のH鎖またはL鎖の両方の6組のCDRをコードする塩基配列として、表4に記載のクローン、好ましくはクローン#2-6および2-4からなる群から選択される何れかのハイブリドーマの抗体の遺伝子においてそれぞれ対応するCDRをコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(13) VH CDR1 をコードする配列番号147の塩基配列と、VH CDR2 をコードする配列番号148の塩基配列と、VH CDR3 をコードする配列番号149の塩基配列と、VL CDR1 をコードする配列番号150の塩基配列と、VL CDR2 をコードする配列番号151の塩基配列と、VL CDR3 をコードする配列番号152の塩基配列とを、それぞれ含有するポリヌクレオチド、または VH CDR1 をコードする配列番号23の塩基配列と、VH CDR2 をコードする配列番号24の塩基配列と、VH CDR3 をコードする配列番号25の塩基配列と、VL CDR1 をコードする配列番号26の塩基配列と、VL CDR2 をコードする配列番号27の塩基配列と、VL CDR3 をコードする配列番号28の塩基配列とを、それぞれ含有するポリヌクレオチド、

(14) 少なくとも抗体のH鎖またはL鎖の可変領域、好ましくは抗体のH鎖およびL鎖両方の可変領域として、表4に記載のクローン、好ましくはクローン#2-6および#2-4からなる群から選択される何れかのハイブリドーマの抗体の遺伝子においてそれぞれ対応する可変領域をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(15) H鎖の可変領域をコードする配列番号145の塩基配列と、L鎖の可変領域をコードする配列番号146の塩基配列とを含有するポリヌクレオチド、

またはH鎖の可変領域をコードする配列番号31の塩基配列と、L鎖の可変領域をコードする配列番号32の塩基配列とを含有するポリヌクレオチドである。

本発明の第5の態様は、第1または第2の態様の抗体を製造する方法である。具体的には第1または第2の態様の抗体を製造する方法であって、

5 (16) 前記(10)の細胞を培養する工程および、該細胞が産生するモノクローナル抗体を採取する工程を含む製造方法、

(17) 前記(11)の細胞を培養する工程および、該細胞が産生するモノクローナル抗体を採取する固定を含む製造方法、

10 (18) 第4の態様のポリヌクレオチド、それを含有する発現ベクター、該ポリヌクレオチドもしくは該発現ベクターを含有する細胞の何れかを用いる工程を含む製造方法である。

本発明の第6の態様は、本件第1または第2の態様の抗体を有効成分として含有する医薬組成物に関するもので、好ましくは血栓性、塞栓性または動脈硬化性の疾患の予防および／または治療のための医薬組成物である。

15 本発明の第7の態様は、本件第1または第2の態様の抗体を用いて試料中のGPVIを検出または定量することにより疾患の診断をする方法であって、好ましくは血液凝固異常に関連する疾患の診断をする方法である。

本発明の第8の態様は、組換えヒト抗体、特に、組換えヒト-ヒトキメラ抗体、具体的にはヒト抗体(例えば、IgM抗体)を遺伝子工学的手法によって組み替えることにより、他のクラスのヒト抗体(例えば、IgG抗体、特にヒトIgG4抗体)またはそれらをコードするポリヌクレオチドを製造する方法であって、例えばハイブリドーマが産生する抗体(例えば、ヒトIgM)をコードするポリヌクレオチドおよび公知のヒト抗体(例えば、IgG4抗体)のポリヌクレオチドを遺伝子工学的手法によって組み替える工程を含む。該手法としては、ハイブリドーマのmRNAおよび／またはゲノムDNAを鋳型として用いたPCR法が挙げられ、具体的には実施例9、好ましくは実施例10記載の方法が挙げられる。実施例10においては、ゲノムDNAを鋳型として複数のエクソンをPCRで増幅し、それら複数(IgGでは4種類)のPCR増幅産物を混合して同時にPCRを実施することにより、簡便に目的の抗体をコードするポリヌクレオチド

20

25

を製造しうる。

図面の簡単な説明

図 1 は、GPVI-Fc 発現プラスミドである pCAGGS-GPVI-Fc の構築を示すフロー
5 チャートである。

図 2 は、組換えウイルスを作製するためのトランスファーベクターのクローン
である pYNG-GPVI-Fc の構築を示すフローチャートである。

図 3 は、抗 GPVI モノクローナルヒト抗体 18 種類の結合活性を、GPVI-Fc
との反応性により、ELISA 法で測定した結果を示したグラフである。 図 4
10 はヒト末梢血より調製した血小板に組換え抗 GPVI ヒト抗体 (R#2-4 および R#2-6)
が結合することを示すグラフである。

図 5 は、各種ヒト IgG 化 GPVI 抗体の GPVI-hFc への結合性を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

15 (構成)

本件発明の第 1 の態様の抗体は、ヒト血小板上に存在する膜糖蛋白質である G
P V I を特異的に認識するものである。なお、本発明の抗体が認識する G P V I は
必ずしも血小板上のものに限られず、例えば、巨核球の G P V I をも認識し得るも
のである。以下に、本発明をさらに詳しく説明する。

20 本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体の作製
方法には特定の方法に限らず、例えばハイブリドーマが産生したモノクローナル
抗体、抗体の遺伝子を組み込んだ組換え細胞が産生したモノクローナル抗体、ま
たは E B V (エプスタイン・バーウイルス) により形質転換した細胞が産生する
モノクローナル抗体のいずれであってもよい。

25 ヒト抗体とは、可変領域全体および定常領域全体のいずれもがヒト由来のアミ
ノ酸配列からなる抗体である。本発明のヒト抗体の作製方法は特定の方法に限ら
ず、例えばヒト-ヒトハイブリドーマが産生したヒト抗体、トランスジェニック
動物が産生したヒト抗体、ヒト抗体の遺伝子を組み込んだ組換え細胞が産生した
ヒト抗体、E B V により形質転換したヒト細胞が産生するヒト抗体、または自己

抗体を産生するヒトのリンパ球を用いて作製したハイブリドーマが産生したヒト抗体のいずれであってもよい。

本発明の抗体はヒトGPVIと特異的に結合する抗体である。本発明の抗体はヒトGPVIと抗体との解離定数（ K_d 値）が好ましくは100nM以下、より好ましくは50nM以下である。ヒトGPVIと抗体との解離定数を測定する方法は特定の方法に限定されず、常法により行うことができる。例えば、チップ上に固定化したGPVI-Fcを用いてB I A C O R E 3 0 0 0のような蛋白質相互作用解析装置により測定することができる。具体的には、実施例7に示されている。

本発明の抗体はコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する作用を有するものである。ここで、血小板凝集は公知の方法で測定し得るが、例えば、血小板凝集能測定装置等で光透過率を指標として凝集率を計算することにより測定でき、一般的には、光透過率が最大となる点の凝集率（以下、最大凝集率と称することがある）で表される。後述の実施例6に記載された方法において、本発明の抗体は好ましくは10 μ g/mL以下、より好ましくは1 μ g/mL以下、さらに好ましくは0.1 μ g/mL以下の濃度で、最大凝集率を好ましくは対照の50%以下に、より好ましくは対照の30%以下に、さらに好ましくは対照の20%以下に、最も好ましくは対照の10%以下に減少させる。コラーゲンによるヒト血小板の凝集の抑制を測定する方法は上記の方法に限定されず、他の常法によっても行うことができる。また、実施例6に記載された方法においてコラーゲン惹起ヒト血小板凝集を抑制する作用、すなわち直接的な作用の有無に係わらず、ヒト血小板がコラーゲンにตอบสนองして凝集する能力を低下ないしは欠除させることにより、間接的にコラーゲン惹起ヒト血小板凝集を抑制する作用を有する抗体が好ましい。例えば実施例15に記載された方法において、本発明の抗体は、例えば30 μ g/mL以下、好ましくは10 μ g/mL以下、より好ましくは1 μ g/mL以下の濃度で、最大凝集率を好ましくは対照の30%以下に、好ましくは対照の10%以下に、より好ましくは対照の5%以下に減少させる。

本発明の抗体は、好ましくは、コラーゲン以外の血小板凝集を惹起する物質、例えばトロンピンによる凝集は抑制せず、後述の実施例6に記載された方法において、本発明の抗体は好ましくは0.1 μ g/mL以上、より好ましくは1 μ g/mL以上、

さらに好ましくは10 μ g/mL以上、特に好ましくは100 μ g/mLの抗体濃度で、最大凝集率が好ましくは対照の80%以上、より好ましくは対照の85%以上、さらに好ましくは対照の90%以上、特に好ましくは対照の95%以上である。コラーゲン以外の血小板凝集を惹起する物質によるヒト血小板の凝集の抑制を測定する方法は上記の方法に限定されず、他の常法によっても行うことができる。

5 本発明の抗体は抗体単独、すなわち血小板凝集を惹起させる物質の非存在下においてヒト血小板の凝集を促進または惹起せず、後述の実施例6に記載された方法において、好ましくは0.1 μ g/mL以上、より好ましくは1 μ g/mL以上、さらに好ましくは10 μ g/mL以上、特に好ましくは100 μ g/mLの抗体濃度で、最大凝集率が好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下である。抗体単独でのヒト血小板凝集を測定する方法は必ずしも限定されず、他の常法によっても行うことができる。また、例えば、全血、好ましくは抗トロンピン剤（アルガトロバン等）で処理した全血を用いて、間接的に血小板に対する影響を評価することもできる。実施例14にその一例を示した。

15 現在まで報告されているヒトGPVIに対する抗体のほとんどは、前記ヒト自己抗体を含めて、in vitroにおいて抗体単独で血小板を活性化させる作用、及び／または、血小板凝集を惹起もしくは促進する作用を有することから、生体に投与した場合、血小板減少を引き起こす可能性が考えられる。Fab断片等の形態では、血小板凝集を惹起しないものも報告されているが、生体内においては、何らかの原因によりFabが架橋または凝集して、IgG等と同様な挙動を示す可能性も完全には否定できない。よって、抗体の活性断片ではなく完全な抗体分子、例えば、IgGの形態でも、そのような作用を示さない、または、そのような作用が低い抗GPVI抗体が好ましい。

25 また、生体内における動態及び安定性は、自然の形態である抗体分子、例えば、IgG等が優れている。一般に、血中半減期はFab等の断片に比べてIgGの方が遥かに長く、特に、血栓症等の慢性的疾患や長期間の抗体投与が必要な病態においては、血中半減期の長い分子形態、特にIgGが望ましい。

本発明の抗体は血小板上のGPVIとコラーゲンとの結合を特異的に阻害するものであってもよく、後述の実施例7に記載された方法において、本発明の抗体

はG P V I とコラーゲンの結合を好ましくは 100 μ g/mL 以下で、より好ましくは 10 μ g/mL 以下、さらに好ましくは 1 μ g/mL 以下、特に好ましくは 0.1 μ g/mL の濃度で 50 % 阻害する抗体である。コラーゲンとG P V I との結合を測定する方法は特定の方法に限定されず、他の常法により行うことができる。

- 5 本発明の抗体は生体内に投与することで、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する。本発明の抗体がコラーゲンによる血小板凝集を抑制する機序としては、(i) 血管内皮細胞傷害により露出したコラーゲンと血小板上に存在するG P V I との結合を本発明の抗体が阻害する、(ii) 本発明の抗体をあらかじめ血小板表面上に存在するG P V I に結合させておきコラーゲンと結合できない状態にする、(iii)
- 10 本発明の抗体が血小板及び／または巨核球表面上のG P V I と結合することでG P V I を内部に取り込ませて (internalize)、結果として血小板表面からG P V I を消失させる、または(iv) 本発明の抗体の有する活性により血小板及び／または巨核球表面に存在するG P V I を切断して結果として血小板表面からG P V I を消失させる、等が考えられる。本発明のヒト抗体によるコラーゲンによる血
- 15 小板凝集抑制の機序としては何れでも良いが、複数の機序を併せ持ってもよい。
- 本発明の第2の態様として、新規なCDRアミノ酸配列または可変領域アミノ酸配列を含有する抗ヒトGPVIモノクローナル抗体がある。

- 抗体の重鎖および軽鎖のN末端側には可変領域が存在し、それぞれ重鎖可変領域 (VH)、軽鎖可変領域 (VL) と呼ばれる。可変領域内には相補性決定領域
- 20 (complementarity determining region; CDR) が存在し、この部分が抗原認識の特異性を担っている。可変領域のCDR以外の部分は、CDRの構造を保持する役割を有し、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。重鎖および軽鎖のC末端側には定常領域が存在し、それぞれ重鎖定常領域 (CH)、軽鎖定常領域 (CL) と呼ばれる。

- 25 重鎖可変領域中には、第1の相補性決定領域 (CDR 1)、第2の相補性決定領域 (CDR 2) および第3の相補性決定領域 (CDR 3) の3つの相補性決定領域が存在する。重鎖可変領域中の3つの相補性決定領域をまとめて重鎖相補性決定領域と呼ぶ。軽鎖可変領域中にも同様に、第1の相補性決定領域 (CDR 1)、第2の相補性決定領域 (CDR 2) および第3の相補性決定領域 (CDR

3) の3つの相補性決定領域が存在する。軽鎖可変領域中の3つの相補性決定領域をまとめて軽鎖相補性決定領域と呼ぶ。

本発明の抗体のCDR配列は必ずしも限定されないが、好ましくはVH CDR1として配列番号47のアミノ酸配列、VH CDR2として配列番号48のアミノ酸配列、VH CDR3として配列番号49のアミノ酸配列、VL CDR1として配列番号98のアミノ酸配列、VL CDR2として配列番号99のアミノ酸配列またはVL CDR3として配列番号100のアミノ酸配列のうち、いずれか1つ以上、好ましくはH鎖の3つ、より好ましくは全てのアミノ酸配列を含有する抗体である。

本発明の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列は必ずしも限定されないが、好ましい抗体として、VHとして配列番号143のアミノ酸配列もしくはVLとして配列番号144のアミノ酸配列のいずれか1つ以上を含有する抗体、またはVHとして配列番号15のアミノ酸配列もしくはVLとして配列番号16のアミノ酸配列のいずれか1つ以上を含有する抗体がある。

なお、本発明の抗体は必ずしも特定のアミノ酸配列のものに限定されず、その活性及び／または抗原性に実質的に影響のない範囲で、本発明の抗体のアミノ酸配列において、例えば可変領域、特にFR部分において1ないし数個のアミノ酸残基の付加、欠失、置換及び／または挿入が許容される。

本発明の抗体は、抗体の定常領域が好ましくはヒト抗体、より好ましくはヒトIgG、さらに好ましくはヒトIgG4由来のアミノ酸配列からなる抗体である。

本件発明の抗体は特定の分子種に必ずしも限定されるものではない。抗体、すなわち免疫グロブリンの構造は重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)とからなり、重鎖のクラス(γ 、 α 、 μ 、 δ 、 ϵ)により5つのイソタイプ(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)に分けられる。このうちIgGとIgAは重鎖の違い(例えばヒトの場合、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$)からサブクラス(例えばヒトの場合 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)に分けられる。軽鎖は、 κ または λ のいずれかのタイプに分類される。本発明の抗体はクラス、サブタイプまたはイソタイプは限定されず、いずれに分類されるものでもあってもよい。好ましくはイソタイプがIgGの抗体であり、さらに好ましくは補体結合性のないという点においてサブクラスがIgG4の抗体である。

14

本発明の抗体としては、その活性、例えば、GPVIとの結合能を有する限りにおいて、抗体の断片または一部でもよい。例えば、Fab (fragment of antigen binding)、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、ジスルフィド安定化抗体 (dsFv)、CDR を含有するペプチド等が挙げられる。

- 5 本発明第3の態様として、本発明の抗体を産生する細胞が提供される。このような細胞の例としては、ハイブリドーマ、形質転換体、または本発明の抗体の遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞等がある。抗体を産生するハイブリドーマとしては、具体的には GPVI に対する自己抗体を産生するヒトから採取した末梢血のリンパ球を用いて作製したハイブリドーマである #2-6 細胞または #2-4
- 10 細胞がある。また、本発明により上記発明の細胞が産生する抗体が提供される。抗体産生細胞は特定の細胞に限定されないが、好ましくは GPVI に対する自己抗体を産生するヒトの末梢血から採取したリンパ球を用いて作製したハイブリドーマが産生した抗体であり、さらに好ましくは #2-6 細胞または #2-4 細胞が産生した抗体、及び該抗体より遺伝子組換え技術により作製した組換え抗体である。
- 15 本発明の第4の態様として、本発明第1または第2の態様の抗体をコードするポリヌクレオチドまたは核酸が提供される。該ポリヌクレオチドは、本発明の抗体のアミノ酸配列をコードするものであれば必ずしも限定されず、ポリヌクレオチドとしては、DNA及びRNAが含まれる。

- 20 本発明の抗体のCDR配列をコードするポリヌクレオチドは必ずしも限定はないが、好ましくは VH CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号147の塩基配列、VH CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号148の塩基配列、VH CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号149の塩基配列、VL CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号150の塩基配列、VL CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号151の塩基配列または
- 25 VL CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号152の塩基配列のうち、いずれか1つ以上、より好ましくはH鎖の3つ、さらに好ましくは全ての塩基配列を含有するポリヌクレオチドであり、また、好ましくは VH CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号23の塩基配列、VH CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号24の塩基配列、VH CDR3 としてのアミノ酸配列

をコードする配列番号 25 の塩基配列、VL CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 26 の塩基配列、VL CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 27 の塩基配列または VL CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 28 の塩基配列のうち、いずれか 1 つ以上、より好ましくは H 鎖の 3 つ、
5 さらに好ましくは全ての塩基配列を含有するポリヌクレオチドである。

本発明の抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは必ずしも限定はないが、好ましくは VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 145 の塩基配列、または VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 146 の塩基配列のいずれか 1 つ、より好ましくは両方の塩基配列を含有する
10 ポリヌクレオチドであり、また、好ましくは VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 31 の塩基配列、または VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 32 の塩基配列のいずれか 1 つ、より好ましくは両方の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである。

本発明の抗体の定常領域をコードするポリヌクレオチドは、好ましくはヒト抗体、より好ましくはヒト IgG、さらに好ましくはヒト IgG4 由来の塩基配列
15 を含有する。

本発明の抗体のヌクレオチド配列を含有する遺伝子を細胞に移入することにより、本発明の抗体を産生する細胞を製造することができる。移入する遺伝子として、好ましくは VH CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 147
20 の塩基配列、VH CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 148 の塩基配列、VH CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 149 の塩基配列、VL CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 150 の塩基配列、VL CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 151 の塩基配列または VL CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 152 の塩基配列のいずれか一つ以上を含有する遺伝子であり、また、好ましくは VH CDR1 としての
25 アミノ酸配列をコードする配列番号 23 の塩基配列、VH CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 24 の塩基配列、VH CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 25 の塩基配列、VL CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 26 の塩基配列、VL CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする

配列番号 27 の塩基配列または VL CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 28 の塩基配列のいずれか一つ以上を含有する遺伝子である。また、移入する遺伝子として、好ましくは VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 145 の塩基配列もしくは VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 146 の塩基配列のいずれか一つ以上を含有する遺伝子、または VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 31 の塩基配列もしくは VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 32 の塩基配列のいずれか一つ以上を含有する遺伝子である。また、移入する遺伝子として、好ましくは VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 145 の塩基配列、および VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 146 の塩基配列を有する遺伝子、または VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 31 の塩基配列、および VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 32 の塩基配列を有する遺伝子、さらに好ましくは、定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する遺伝子である。

(製法)

15 本発明の第 5 の態様として、抗体の生産方法が提供される。この発明の抗体を作成する方法には限定はないが、以下に記載の方法でも作成しうる。すなわち、GPVI に対する自己抗体を産生する患者の末梢血からリンパ球を採取し、体外免疫法で活性化したリンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製する。作製したハイブリドーマが産生する抗体を得て、GPVI との結合能を有し、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する活性を有する抗体を選択し、この抗体を産生する細胞を得る。この細胞を培養することにより、本発明の抗体を得ることができる。

25 本発明の抗体は、公知の方法（それぞれ Nature,312:643,1984、Nature,321:522,1986 以来、多くの方法が開発されている）を用いた組換えヒト抗体としても作製できる。まず、本発明の抗体を産生する細胞、例えば、リンパ球、好ましくは、抗 GPVI モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH または VL をコードする核酸、例えば cDNA を取得し、塩基配列およびアミノ酸配列を決定する。次に、取得した VH および VL をコードする cDNA を同一細胞又は別のヒト細胞より作製したヒト抗体 CH および／またはヒト抗

体 CL をコードする遺伝子を含有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。動物細胞に導入する遺伝子の作製方法には限定はなく、ハイブリドーマ由来のゲノム DNA または cDNA から得てもよく、ハイブリドーマの mRNA から PCR によって得てもよく、また化学合成によっても得てもよい。

本発明の抗体の VH または VL をコードする核酸を組み込むベクターとしては、必ずしも限定されないが、蛋白質遺伝子等の発現に汎用され、特に抗体遺伝子の発現に適合するベクターまたは高発現用ベクターが好ましい。好適な例としては、EF プロモーター及び／または CMV エンハンサーを含有するベクターが挙げられ、例えば、pEF-BOS または実施例で用いたベクターがある。また、通常 VH または VL をコードする核酸を組み込んだ発現ベクターをそれぞれ作製し、宿主細胞に *c o t r a n s f e c t* するが、単一の発現ベクターに組み込んでも良い。

発現ベクターを導入する宿主細胞としては、必ずしも限定されないが、蛋白質遺伝子等の発現に汎用され、特に抗体遺伝子の発現に適合する細胞が好ましい。例えば、細菌（大腸菌等）、放線菌、酵母、昆虫細胞（SF9 等）、哺乳類細胞（COS-1、CHO、ミエローマ細胞等）が挙げられる。

組換えヒト抗体の作製に用いるヒト抗体の定常領域としては、例えば、ヒト抗体重鎖定常領域としては C_γ1 や C_γ4、ヒト抗体軽鎖定常領域としては C_κ 等の任意のヒト抗体の定常領域を用いることができる。

ヒトの CDR 配列を含有する抗体は、ヒト体内に天然に存在する抗体の他に、ヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体の活性断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体の活性断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体の活性断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全な H 鎖および 2本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

本発明は重鎖 2 本と軽鎖 2 本からなる抗体のほかに、本発明の抗体の活性断片

等も含まれる。抗体の活性断片としては、例えば Fab (fragment of antigen binding)、Fab'、F(ab')₂ があり、抗体の活性断片をリンカー等で結合したものとして例えば一本鎖抗体 (single chain Fv : scFv) やジスルフィド安定化抗体 (disulfide stabilized Fv : dsFv) があり、抗体の活性断片を含むペプチドとして例えば CDR を含有するペプチドが挙げられる。これらは、本発明の抗体を適当な蛋白分解酵素で処理する方法または遺伝子組換え技術等、公知の方法で製造することができる。

本発明の Fab は、本発明の抗 GPVI 抗体を IgM の場合はタンパク質分解酵素ペプシンで処理して、IgG の場合はタンパク分解酵素パパイニンで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

本発明の F(ab')₂ は、本発明の抗 GPVI 抗体をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

本発明の Fab' は、GPVI に特異的に反応する F(ab')₂ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。

本発明の scFv に含まれる VH および VL は、本発明のハイブリドーマが産生する抗体またはヒト抗体のいずれをも用いることができる。本発明の scFv は、本発明の抗 GPVI 抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFv を製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明の dsFv に含まれる VH および VL は本発明の第 1 または第 2 の態様の抗体のいずれに由来するものをも用いることが

できる。

本発明の dsFv は、本発明の抗 G P V I 抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFv を製造することができる。

CDR を含むペプチドは、H 鎖または L 鎖 CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR は、直接または適当なペプチドリinker を介して結合させることができる。本発明の CDR を含むペプチドは、本発明の抗 G P V I 抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得した後、CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDR を含むペプチドを製造することができる。また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体には、例えばハイブリドーマが産生するヒト抗体、EBV を用いて形質転換した細胞が産生するヒト抗体、cDNA より発現した組換えヒト抗体、またはそれらの抗体の活性断片に放射性同位元素、タンパク質、ペプチドまたは低分子の化合物などを結合させた抗体も含まれる。本発明の抗 G P V I 抗体または抗体の活性断片の H 鎖或いは L 鎖の N 末端側或いは C 末端側、抗体または抗体の活性断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体の活性断片中の糖鎖に放射性同位元素、タンパク質、ペプチドあるいは低分子の化合物などを化学的手法〔抗体工学入門（金光修著 1994 年（株）地人書館）〕により結合させることにより製造することができる。ハイブリドーマとは、リンパ球と、ヒト、マウス、ラット等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

モノクローナル抗体を作製する場合は、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することが好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の

細胞が使用可能である。これにはヒト由来のSKO-007、ヒトマウスヘテロミエローマであるSHM-D33、マウス由来のP3、P3U1、SP2/O、NS-1、ラット由来のYB2/O及びY3-Ag1, 2, 3等の骨髓腫細胞が含まれる。

5 ハイブリドーマ作製に用いる細胞としては、必ずしも限定はされないが、ハイブリドーマ作製に用いる複数の細胞のうち少なくとも1種はヒト由来の細胞であることが好ましい。ヒト由来の細胞としては、末梢血、リンパ節または脾臓等のヒトのリンパ球が用いられ、特に自己抗体の産生が確認されているヒトのリンパ球が好ましい。

10 リンパ球の活性化は公知の方法により行なうことができる。例えば、ヒトの末梢血又は脾臓からB細胞を採取し、*in vitro immunization*法により抗原刺激し、ヒトのB細胞由来のミエローマ細胞あるいはマウス由来のミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製する方法、EBVでトランスフォームし、マウスミエローマ細胞と融合させる方法、PWM等のマイトジェンで刺激
15 しB細胞をポリクローナルに活性化し融合させる方法（免疫実験操作法I・II、右田俊介他編集、南江堂）等が好ましい。

細胞を刺激するために用いる抗原は、必ずしも限定はない。抗原とするタンパク質の由来動物は、抗体の使用目的に応じて適宜選択し得るが、天然物由来のもの、遺伝子工学的に作成したもの、化学的に合成したもの、他のタンパク質やペ
20 プチドとの融合タンパク質等、いずれでもよい。例えば血小板、血小板の膜、精製GPVI、組換えGPVI、GPVI-Fcを用いることができ、好ましくはGPVI-Fcである。

活性化リンパ球とミエローマ細胞との融合は、Milstein等の方法(Methods in Enzymol., 73 巻 3 頁)等の公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、
25 融合剤としてポリエチレングリコール(PEG)を使用する方法（単クローン抗体実験操作法入門、安東民衛・千葉丈／著、講談社）または電気融合法等が挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率であれば限定されないが、活性化リンパ球に対し、ミエローマ細胞を1/10量ないし等量を使用することが好ましい。細胞融合をPEG（平均分子量1,000～

4, 0 0 0) を使用して行なう方法ではPEG濃度は必ずしも限定されないが50.%で行なうことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド (DMSO) 等の補助剤を添加してもよい。融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1～5分間反応後、培地を添加することにより終了する。

この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを含む培地 (HAT培地) 等の選択培地で1日～10日間培養し、未融合細胞と分離する。得られたハイブリドーマをその産生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って単クローン化

10 じ、単クローン性抗体産生ハイブリドーマとして樹立する。

ハイブリドーマの産生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。ここで抗体の活性は、第一段階として、GPVI抗原への結合能を、第二段階として、GPVIとコラーゲンの結合を阻害する活性を検出する。第一段階の活性の検出方法としては、例えばELISA法、ウェスタンブロット

15 法、ラジオイムノアッセイ法が挙げられる。第二段階の活性の検出法としては、例えばELISA法 (結合阻害型)、タンパク相互作用解析法 (BIACORE等)、血小板凝集抑制測定法が挙げられる。

樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を得ることができる。

20 抗体の精製は、塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法またはアフィニティークロマト法等の公知の精製手段を用いて行うことができる。

抗体の濃度は公知のタンパク質の定量方法、例えば280nmにおける吸光度の測定により測定することができる。

本発明の抗GPVI抗体の抗原結合性を確認する方法、または本発明の抗GPVI抗体を用いて生物試料中のGPVIを検出する方法としては、蛍光抗体法、

25 免疫酵素抗体法(ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロットティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、

1987 年)、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (東京化学同人、1986 年)]
などを用いることができる。

本発明の抗体の、例えばコラーゲンのような血小板凝集を惹起させる物質によるヒト血小板凝集へ及ぼす影響の測定方法は、必ずしも限定はされず、常法により行うことができる。具体的には、ヒト血小板浮遊液に本発明の抗体を添加し、その後コラーゲンを添加し、血小板凝集能測定装置等で凝集率を測定する。

抗体単独でのヒト血小板凝集を測定する方法は必ずしも限定されず、常法により行うことができる。具体的には、ヒト血小板浮遊液に本発明の抗体を添加し、血小板凝集能測定装置等で凝集率を測定する。

(用途)

本発明の抗体は、ヒト GPVI に特異的に結合するものであり、本発明の抗体、抗体の活性断片、化学物質と結合させた抗体の修飾物、またはこれらの混液を含む組成物等は、ヒトの疾患の予防、診断および治療の用途、また被験試料、細胞および組織等のヒト GPVI の検出の用途等を含めて、種々の用途がある。

特に、本発明の抗体の一態様としては、抗体単独ではヒト血小板の凝集を起こさないものであるから、抗体の活性断片だけでなく抗体自体もヒト血小板の凝集を抑制し、活性断片とせず抗体そのものをヒトに投与して、ヒトの疾患の予防、診断および治療等に用いることができる。

用途：医薬

本発明の抗体は GPVI への結合の特異性が高く、かつヒト由来であって、好ましくは、単独ではヒト血小板の凝集を促進または惹起する作用を有さないことから、特に、ヒトの疾患、例えば、血小板の活性化もしくは凝集、または血管内皮障害もしくは動脈硬化性の反応によって引き起こされる疾病の予防及び／または治療に有効であり、また、血栓もしくは塞栓に起因する疾患、例えば、血栓症及び塞栓症等の予防及び／または治療に利用することができる。これらの疾患には、動脈性血栓症のみならず、静脈性血栓症も含まれ、また、心房細動に起因する脳梗塞も含まれる。

本発明の抗体により予防及び／または治療が可能なヒトの疾患または病態としては、具体的には、心筋梗塞、血栓溶解療法時、経皮的冠静脈内腔拡張術施行時、ステント施行時、バイパス手術施行時もしくは人工血管施行時の、またはこれらの後の血管内皮肥厚、血管再狭窄、狭心症もしくは心筋梗塞、心房細動もしくは心房粗動及びこれらに起因する血栓症、塞栓症もしくは脳梗塞、閉塞性血栓性血管炎、急性動脈閉塞症、閉塞性動脈硬化症または深部静脈血栓症等があり、脳梗塞（アテローム性血栓性梗塞、ラクナ梗塞、心原性梗塞）、一過性脳虚血発作、くも膜下出血後の脳血管攣縮、肺血栓、肺塞栓症、血管性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、播種性血管内凝固症候群、体外循環時での血液凝固防止、全身性エリテマトーデス、多発性動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、紫斑病性腎炎、糖尿病に伴う内皮細胞傷害、糖尿病性腎炎、糖尿病性網膜症、腎塞栓、移植治療に伴う合併症（肝静脈閉塞症、移植片対宿主病）等が挙げられる。

本発明の抗体は、また、先述の予防及び／または治療対象の疾患に対して、単独で投与されるか、あるいは他の薬理活性成分と併用されることもできる。かかる薬理活性成分とは、例えば公知の血栓溶解剤（例えば組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）ならびにそれらの誘導体（改変体あるいはいわゆる第二世代といわれるものも含む）、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ）、あるいは公知の抗血小板薬（例えばアスピリン、チクロピジン、クロピドグレル、トロンボキサランアンタゴニスト、トロンボキサラン合成阻害剤、GPIIb/IIIaアンタゴニスト）、公知の抗凝固薬（例えばワーファリン、ヘパリン、低分子ヘパリン、ペントサッカライド、トロンビン阻害剤、FXa阻害剤、FVIIa阻害剤）などが挙げられる。ここで併用とは、本発明の抗体と、当該薬理活性成分とをともに含む合剤を投与する他、本発明の抗体と当該薬理活性成分とがそれぞれ別個の製剤として一時期にもしくは時間をずらして投与される場合をも含み、患者の血中において同時に存在する限りにおいて投与の形態は問われない。

本発明の抗体ならびに製剤学的に許容される組成物を有効成分として含有する医薬品は、通常用いられる製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて例えば錠剤、注射剤、散剤、坐剤等に調製され、人間その他の動物に対して投与され

る。

ヒトに適用する場合、その投与経路は、経口投与、静脈内投与（ボラス投与、連続点滴、間欠的点滴）、皮下投与、筋肉内投与、関節内投与、経皮投与、経鼻投与等があるが、通常、経口投与または静脈内投与である。本発明の抗体のヒト

5 に対する臨床投与量は適用される患者の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜決定されるが、通常成人一日あたり、静脈内投与で1～10000mg、好ましくは10～1000mgであり、これを1回あるいは数回にわけて投与する。投与量は種々の条件で変動するので、上記投与量範囲より少ない量で十分な場合もある。

- 10 ここで、本発明の抗体はGPVIを認識する点で共通するものの、本発明は異なる機序を有する多様な抗体を包含するものである。例えば、GPVIとコラーゲンの結合を直接阻害する、またはGPVIを切断することにより血小板の活性化及び／または凝集を抑制する抗体は比較的即時的な効果を期待できるので、少なくとも疾患の急性期（例えば、心筋梗塞時もしくはPTCA実施時またはそれ
- 15 らの直前もしくは直後）において有用である可能性がある。このような場合には、好ましくは血中の血小板表面のGPVIの大部分に本発明の抗体を結合させるために比較的大量の抗体を投与、例えば、単回もしくは分割静注または点滴静注することができる。また、GPVIを内部に取り込ませる抗体は即時的効果は期待できないかもしれないが、ヒト血小板の血中での寿命（9～10日前後）及びヒ
- 20 ト抗体の血中半減期（IgGの場合、数週間）を考慮すると持続的な効果が期待できるので、例えば、疾患の慢性期（例えば、心筋梗塞発症後またはPTCA実施後数日～数ヶ月）において有用である可能性がある。このような場合には、血中の血小板のコラーゲンに対する反応性を部分的に、好ましくは完全に、阻止する程度に血小板表面のGPVIを焼失させるために必要な量の抗体を比較的間隔
- 25 を置いて、例えば、1クールを数日から数週間として、投与、例えば、単回もしくは分割静注または点滴静注することができる。従って、好ましい態様において、本発明の抗体はこれらの効果を併せ持っても良い。また、それぞれの効果が期待できる抗GPVI抗体を複数組み合わせ合わせた治療を実施しても良い。

非経口投与のための組成物は、通常、許容される担体、好ましくは水性担体中

に溶解された免疫グロブリンの溶液又はその混液を含む。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、リン酸塩緩衝生理食塩水（PBS）、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒトアルブミン溶液等が用いられ得る。これらの溶液は、無菌であり、そして一般的には微粒子物質が存在しない。これらの組成物は、慣用の、良く知られた滅菌方法により滅菌されうる。組成物は、生理学的条件に近づけるために、要求に応じて、薬学的に許容できる補助物質、例えばpH調節及び緩衝化剤、毒性調節剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム及び乳酸ナトリウムを含みうる。これらの製剤中の抗体の濃度は、広範囲に、即ち、約0.005重量%未満（通常は、少なくとも約1重量%）から15又は20重量%と大きい量まで変化することができ、主として、選択された投与の特定の様式に従って、液容量、粘性等に基づいて選択される。

非経口投与組成物を調製するための現実の方法は、本技術分野の熟練者にとって公知又は明白であり、例えば、レミントンズ ファーマシューティカルサイエンス（第15版、マックパブリッシングカンパニー、イーストン、ペンシルバニア、1980）（本引例をもって本明細書の一部と成す）に更に詳細に記載されている。洗浄（lavage）又はその他のルートのために適した組成物は、意図される特定の使用に従って選択される。いくつかの薬学的組成物は、抗GPVI抗体及びその疾患に於いて常用される他の治療剤を含みうる。いずれの場合も、ボーラス投与および持続投与が適用されうる。また、予防的または治療的有効量は、対象疾患、病態および患者の状態等によって適宜決定される。

本発明の抗体は、貯蔵のため凍結又は凍結乾燥され、使用に先だって適当な担体中で再構成されうる。この技術は、慣例の免疫グロブリンにおいて有効であると知られており、公知の、凍結乾燥及び再構成技術が用いられ得る。凍結乾燥及び再構成が、様々な程度の抗体の活性損失をもたらしうる（例えば、慣例の免疫グロブリン、IgM抗体は、IgG抗体よりも大きい活性損失を生じる傾向にある）ということ、及び使用レベルが、それを補うために調節されなければならないかもしれないということは、当業者にとって認識されることである。

用途：GPVI検出

26

本発明の抗体または抗体の活性断片を用いて、被検試料中のGPVIを検出する方法は、被検試料と本発明の抗体または抗体の活性断片を接触させる工程、本発明の抗体または抗体の活性断片に結合した被検試料中のGPVIを検出する工程を含み得る。被検試料中のGPVIを定量する工程を更に含んでも良い。被検試料中のGPVIを検出する方法により、疾患の診断を行うことができる。特に、ヒトの疾患、例えば、血栓性、塞栓性または動脈硬化性の疾患の診断に利用することができる。

本発明の抗体を用いて、被検試料中のGPVIを検出する方法としては、サンドイッチELISA系、インヒビションELISA系、蛍光抗体法、免疫組織化学染色法、放射性物質標識免疫抗体法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法などがあげられるが、これらに限定されるものではない。対象となる被検試料は限定されないが生物試料が用いられ、動物、特にヒトの体液あるいは、組織、細胞および菌体ならびにそれらの抽出液、培養上清、塗末標本および切片が挙げられるが、血小板であることが好ましい。

本発明の抗体または抗体の活性断片を用いて、GPVI又は血小板上のGPVIのコラーゲンに対する結合を阻害する方法は、GPVI又は血小板表面上のGPVIと本発明の抗体または抗体の活性断片を接触させる工程、GPVI又は血小板表面上のGPVIとコラーゲンを接触させる工程、本発明の抗体または抗体の活性断片によるGPVI又は血小板表面上のGPVIのコラーゲンに対する結合を阻害する工程の少なくとも一つを含み得る。

本発明の抗体または抗体の活性断片によるGPVI又は血小板上のGPVIの血小板凝集に対する阻害作用を検出する工程は、前述のin vitro アッセイ系の他、in vivo アッセイ系を用いることも可能である。ここでいうin vivo アッセイ系とは、生体に本発明の抗体または抗体の活性断片を投与し、当該抗体または抗体の活性断片が生体の機能やステータスに与える影響を検出する評価系を意味する。例えば、コラーゲン投与モデル動物に本発明の抗体または抗体の活性断片を投与し、病態の重篤度の指標に与える影響を評価する系が例として挙げられる。

実施例

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。

実施例1 ヒト可溶型GPVI-Fcの作製

in vitro immunization用の抗原及びスクリーニング用抗原として用いるため、ヒトGPVIの細胞外ドメインとヒトIgGのFcフラグメントとの融合蛋白質（GPVI-Fc）を作製した。なお、DNA 操作は特に断りのない限り、モレキュラークローニング第二版（Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed., Joseph S., et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)）にしたがって行った。

GPVI-Fc発現プラスミドは、以下の手順により遺伝子工学的に作製した。まず、江角らがクローニングしたヒトGPVI cDNAを組込んだプラスミドpBK-CMV-GPVI-1（Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000 Oct 14;277(1):27-36）を鋳型とし、センスプライマー1（配列番号33。5'末端側に制限酵素Xba I 認識配列を含む）およびアンチセンスプライマー1（配列番号34。5'末端側に制限酵素Bam H I 認識配列を含む）を用いてPCR を行い、ヒトGPVI細胞外ドメイン（269 アミノ酸）をコードするcDNA を得た。一方、ヒトIgG₁FcドメインcDNA が含まれるプラスミドpM1304（W097/42319に記載）を鋳型としPCR を行い、あらためてGPVI細胞外ドメインにインフレームで連結可能となるヒトIgG₁Fcドメイン（506 アミノ酸）をコードするcDNA を得た。このPCRのためのセンスプライマー2（配列番号35）は、ヒトIgG₁FcドメインN 末端側をコードするcDNA 配列を含み、さらにその5'末端側に制限酵素BamH I 認識配列を配置して設計し、またアンチセンスプライマー2（配列番号36）はヒトIgG₁FcドメインC 末端側に制限酵素KpnI認識配列を配置して設計したものを使用した。PCRにより得られた二つのcDNA断片を制限酵素で処理した後、哺乳動物細胞を宿主とする発現プラスミドであるpCAGGS（特許第2824434号公報）のクローニング部位に挿入した。すなわち、ヒトGPVI細胞外ドメインをコードするcDNA断片は制限酵素Xba I およびBamH I で切断し、

ヒトIgG₁FcドメインをコードするcDNA断片は制限酵素BamH I およびKpnIで切断した。pCAGGSのクローニング部位にはリンカーを挿入し、適当な制限酵素切断部位 (Xba I、KpnI) を付加した後に、ヒトGPVI細胞外ドメインをコードするcDNAおよびヒトIgG₁FcドメインをコードするcDNAがインフレームで連結させて挿入した。
5 。この工程を図1に示す。

得られた発現プラスミド (pCAGGS-GPVI-Fc) を基にバキュロウイルスへのトランスファーベクターおよび組換えウイルスを作製し、カイコ蛹での発現を行った。すなわち、pCAGGS-GPVI-Fcを制限酵素Xba I およびHind IIIで切断することによりGPVI-FcをコードするDNA断片を切り出し、その末端をBlunting Kit (TAKARA
10) を用いて平滑末端とした。そのDNA断片をバキュロウイルスへのトランスファーベクターであるpYNGのSma I 部位に挿入し、ポリヘドリンプロモーターに対して正方向で挿入されているクローン (pYNG- GPVI-Fc) を選択した。この工程を図2に示す。そのクローンを基に組換えウイルスを作製し、ウイルス感染細胞でのGPVI-Fc蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで確認した。最終的に作製
15 したウイルス溶液をカイコ蛹に接種することにより、GPVI-Fcの発現を行った。

その結果、カイコ蛹磨砕液中に十分な量のGPVI-Fcの発現が認められ、その磨砕液をプロテインAカラム (Prosep-A、ミリポア) に供することによりGPVI-Fcの精製を行った。

20 実施例2 抗GPVI自己抗体を有するヒトの末梢血リンパ球を用いた抗GPVIモノクローナルヒト抗体の作製

抗GPVIモノクローナルヒト抗体はGPVIに対する自己抗体を有していることが確認されている供血者のリンパ球とミエローマ細胞を融合し、以下のように調製した。まず、書面にて同意を得た供血者から無菌的に採血したヘパリン加血液
25 6mlを、Ficoll-Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB) を3ml加えたLeucosep (Greiner) に重層し、1000gにて遠心し、リンパ球分画を回収した。得られたリンパ球分画をダルベコPBS (以下、D-PBSと記載する場合がある) にて800gで2回遠心洗浄後、10%FCS (ウシ胎児血清) を含むHybridoma-S

FM (Invitrogen) に懸濁し、 7.4×10^7 個の細胞を得た。

- 前記リンパ球分画に、PHA-L (Sigma) を $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、LPS (DIFCO) を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、実施例 1 記載の精製 GPVI-Fc を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにそれぞれ添加し、細胞濃度は 1×10^6 個/ ml となるように調製し 3 日間培養しリンパ球の活性化を行った。なお、培養時に、さらに IL-4 (Pep
- 5 roTech) を $400 \text{ U}/\text{mL}$ を添加し、また、培養期間を 8 日間にする等、適宜条件を微調整し、リンパ球の活性化を試みた。細胞融合は安藤ら (単クローン抗体実験操作法入門、安東民衛・千葉丈／著、講談社) にしたがひ、活性化したヒトリンパ球とマウスミエローマ細胞 (SP2/O-Ag14、ATCC C
- 10 RL1581) を 4:1 で混合し 50% ポリエチレングリコール (Sigma) により細胞を融合した。融合後、10% FCS、 $1 \times \text{HAT}$ (Invitrogen) を含む Hybridoma-SFM に懸濁し、10 日間培養後に、増殖したハイブリドーマの培養上清をサンプリングし、目的の抗体を産生しているハイブリドーマを ELISA 法によりスクリーニングした。
- 15 すなわち、精製 GPVI-Fc を 1 ウェルあたり $0.25 \mu\text{g}$ 添加して固相化したイムノプレート (Maxisorb、NUNC) にハイブリドーマの培養上清 $50 \mu\text{L}$ を添加し 37°C で 1 時間反応した。対照としてヒト精製 Fc (Athens Research And Technology, Inc.) を同様に固相化したウェルを調製し、培養上清を添加し反応させた。反応終了後、各ウェルを
- 20 洗浄し、次にペルオキシダーゼ標識抗ヒトカッパ抗体 (DAKO、P129) またはペルオキシダーゼ標識抗ヒトラムダ抗体 (DAKO、P130) を各ウェルに添加した。 37°C 1 時間反応後、同様に洗浄し、TMB 発色液 (BioFix) を各ウェルに添加し 10 分反応後、 0.5 M 硫酸溶液を添加し反応を停止した。
- 25 は吸光度が上昇せず、GPVI-Fc を固定化したウェルのみで吸光度が上昇する、すなわち抗 GPVI 抗体を産生しているハイブリドーマが存在するウェルを選択した。

さらに、限界希釈法により培養を行い単クローンを得た。すなわち、10 日間培養後の培養液について前記と同様にスクリーニングを行い、抗 GPVI モノク

ローナルヒト抗体を産生するハイブリドーマを得た。

選択したハイブリドーマを10%FCSを含むHybridoma-SFMで培養後、無血清化し抗体を産生させた。IgM抗体はマニュアルに従いProsep-ThiosorbMカラム(MILLIPORE)により精製し、IgG抗体はProsep-Aカラム(MILLIPORE)を用いて精製した。精製抗体は0.076Mリン酸緩衝液(PBS)(pH6.4)で透析し、280nmの吸光度より濃度を算出した。

実施例3 作製した抗GPVIモノクローナルヒト抗体のタイピング

10 実施例2で得られた抗体のタイピングはHuman IgG Subclass Profile ELISA Kit (Zymed Laboratories) 及びウエスタンブロッティングにより行った。ELISAはマニュアルに従い、抗体の希釈液をサンプルとして使用した。キットで検出されなかった抗体は、それぞれ約1 μ gを4~20%のSDS-PAGEにより分離後、PVDF膜(MILLIPORE)に転写し、ウエスタンブロッティングを行った。すなわ

15 ち、PVDF膜をブロッキング後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgM抗体(P0322、DAKO)と反応した。洗浄後、ECL試薬(Amersham Pharmacia Biotech AB)と反応させ、ライトキャプチャ(ATTO)により反応するバンドを検出した。得られた抗GPVI抗体のタイ

20 ピング結果を表1に示した。

表1 タイピング結果

(1) PHA-LおよびLPS存在下で、3日間培養した場合	
クローン番号	サブクラス
#2-4	IgM/ λ
#2-6	IgM/ λ
#2-7	IgM/ λ
#2-16	IgM/ κ
#2-37	IgM/ λ
(2) PHA-L、LPSおよびIL-4存在下で、8日間培養した場合	
クローン番号	サブクラス
#4-1	IgG 2/ λ
#4-7	IgG 2/ λ
#4-28	IgM/ κ
#4-43	IgM/ λ
#4-44	IgM/ λ
#4-45	IgM/ λ
#4-52	IgM/ λ
#4-56	IgM/ κ
#4-62	IgM/ λ
#4-65	IgM/ λ
#4-68	IgM/ κ

5 実施例4 抗GPVIモノクローナルヒト抗体のGPVI結合活性の測定 (ELISA法)

実施例2で得られた精製抗体のGPVI結合活性を、実施例2に記載のELISA法にて測定した。実施例2においてハイブリドーマの培養上清の代わりに、実施例2で調製した精製抗GPVIモノクローナルヒト抗体20ngを添加し、対照として精製ヒトIgM (Cappel)を使用した。

その結果、図3に示すように対照として使用したヒトIgMでは吸光度が上昇しないのに対し、選択されたハイブリドーマの産生する精製抗GPVIモノクローナルヒト抗体では、いずれも顕著な吸光度上昇が認められ、調製した抗体が特異的にGPVIを認識していることが確認された。

実施例 5 抗GPVIモノクローナルヒト抗体によるGPVI-Fcのコラーゲンへの結合抑制の検討

実施例 2 で得られた抗体が特異的に GPVI とコラーゲンとの結合を阻害していることを確認する目的で蛋白相互作用解析装置 (BIACORE 3000) を用いた解析を行った。まず、ヒトコラーゲン Type I (生化学工業) を BIACORE 社のマニュアルに従い、CM5 チップ (BIACORE) 上にコラーゲンを 6303 RU (Resonance Unit) 固定化した。ここで RU は BIACORE 装置で使用するレスポンスを表す単位であり、1000 RU は約 1.2 ng の物質が結合したことを示す。GPVI-Fc と、精製ヒト IgM または精製抗 GPVI 抗体とをそれぞれ 50 μ g/ml となるように混合し、コラーゲン固定化チップにインジェクトした。

実施例 6 ヒト血小板凝集能に及ぼす抗体の影響

15 文書により同意を得た健常人より採血した血液から常法 (Takayama H et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 174, pp.922-927 (1991)) に準じて血小板を調製し、終濃度約 $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 個/mL で使用した。血小板凝集能の測定は、Ezumi Y et al. (Blood, 99, pp.3250-3255 (2002)) に準じて以下のように実施した。被検物質である実施例 2 で得た抗体またはその溶媒を添加した後、37°C で 5 分間インキュベートした。さらに CaCl₂ 溶液を終濃度で 1 mM となるように添加し、37 °C で攪拌しながら 3 分間インキュベートした。コラーゲン (NYCOMED PHARMA GMBH) の溶液を終濃度で 3 ないし 4 μ g/mL となるように加え、血小板凝集能測定装置 (興和株式会社 PA-200) にて光透過率を経時的に測定する事により、抗体のコラーゲン惹起血小板凝集抑制作用を測定した。その結果を表 2 に示した。なお、血小板凝集の測定結果は、光透過率が最大となった時点での透過率 (最大凝集率) で表した。

次に、コラーゲンの代わりに血小板凝集惹起物質としてヒトトロンビン (Sigma) を 0.3 単位/mL の濃度になるように添加し、同様に抗体の血小板凝集へ及ぼす影響を測定した。その結果、10 μ g/mL の抗体濃度における最大凝集率は、# 2 -

4 抗体の場合は96%であった。

さらに、前記の測定において、コラーゲン等の血小板凝集惹起物質を添加せずに、被検物質（抗体）単独での血小板凝集惹起作用を測定した結果、10 μ g/mLの抗体濃度における最大凝集率は、#2-4抗体の場合は3%であった。

- 5 以上の結果から、#2-4抗体は、単独で血小板凝集惹起作用は有さず、コラーゲンによる血小板凝集のみを特異的に抑制する事が観察された。

表 2

(A) #2-4抗体

抗体終濃度	最大凝集率 (コラーゲン 4 μ g/mL)
対照	77%
0.1 μ g/mL	63%
0.3 μ g/mL	49%
1 μ g/mL	27%

10

実施例7 抗GPVIモノクローナルヒト抗体の解離定数の測定

実施例6で血小板凝集抑制活性が確認された抗体の解離定数を蛋白相互作用解析装置（BIACORE 3000）を用いて測定した。実施例1記載の精製GPVI-FcをBIACORE社のマニュアルに従い、CM5チップ上に固定化した。
15 #2-4抗体についてBIACORE 3000のWizard Programにて測定し、BIACORE社のBIAevaluationソフトを用いて解析したところ、#2-4抗体の解離定数（ K_d ）は 4.13×10^{-8} Mと算出された。

20

実施例8 抗GPVI抗体のCDRアミノ酸配列の決定

実施例2のELISA法によるスクリーニングにて選択されたハイブリドーマを実施例2に従って培養した。細胞濃度が 2×10^5 個/mLになった段階で培養液を回収し、回収した細胞よりTRIzol（Invitrogen）を用いて

mRNAを抽出した。次に、Superscript First-strand synthesis System II (Invitrogen)のマニュアルに従って、mRNAからオリゴdTプライマーにより一本鎖cDNAを合成した。論文 (J. Immunol. Methods 1995 Feb 27;179(2):203-14 および J. Mol. Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97) の情報を参考にして重鎖および軽鎖可変領域を増幅させるPCRプライマー (配列は表3に記載) を合成し、先に調製したハイブリドーマ由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った。増幅されたDNAのバンドを2%アガロースを用いて確認後、PCR産物をスピンカラム (Sigma) を用いて精製した。精製されたPCR産物とpT7 Blue Tベクター (Novagen) を混和し、Ligation kit ver II (TAKARA) を用いて16℃、30分でライゲーション反応を行った。その反応液を用いてコンピテントセルE. coli (JM109、TAKARA) にトランスフォーメーションを行い、X-Gal、IPTGを含むLBプレートに播種し、1晩培養した。出現した白コロニーをピックアップし、Ex Taq polymerase (TAKARA)、U-19mer primer (配列は表3に記載)、T7 promoter primer (配列は表3に記載、Novagen) を用いて、コロニーダイレクトPCRでインサートがベクターに挿入されていることを確認した。次に、インサートが確認されたコロニーをLB培地で1晩培養し、QIAGEN plasmid mini kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドはU-19mer primer、T7 promoter primerを用いてDYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (アマシャムバイオサイエンス) により反応後、シーケンサーABI PRISM3100 (アプライドバイオシステムズ) を用いて解析を行った。

決定したCDR配列を表4に示した。なお、#2-4のクローンのVL CDR3をコードする塩基配列 (配列番号28) のうち31番目のグアニンは実際には検出されていないが、他のクローンの解析結果よりグアニンであることが予想される。この予想に基づいて、#2-4のクローンのVL CDR3 (配列番号12) およびVL CDR (配列番号16) のアミノ酸配列を記載している。

表 3

プライマー	配列 (配列番号)
PCRプライマー: #2-37 VH 5'	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (37)
PCRプライマー: #2-37 VH 3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC (38)
PCRプライマー: #2-4 VH 5'	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (39)
PCRプライマー: #2-4 VH 3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC (40)
PCRプライマー: #2-37 VL 5'	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCGGC (41)
PCRプライマー: #2-37 VL 3'	AGAGGAGGGTGGGAACAGAGTGAC (42)
PCRプライマー: #2-4 VL 5'	CAGTCTGTCTTGACGCAGCCGGC (43)
PCRプライマー: #2-4 VL 3'	AGAGGAGGGTGGGAACAGAGTGAC (44)
U-19mer primer	GTTTCCCAGTCACGACGT (45)
T7 promoter primer	CTAATACGACTCACTATAGG (46)

表 4

クローン 番号	重鎖 (H鎖)			
	CDR1 番号)	(配列	CDR2 (配列番号)	CDR3 (配列番号)
#2-4	SYAMS	(7)	AISGSGSTYYADSVKG (8)	HFILTYHY (9)
#2-6	NYAMA	(47)	AISVSGTSTAYADSVKG (48)	RGLPHPKYFCDS (49)
#2-7	SNYMS	(50)	VIYSGGS-TYYADSVKG (51)	LKADHYDSLAPDFDY (52)
#2-16	SYDMH	(53)	AIGTAGD-TYYPGSVKG (54)	AGKMWWRGAFDI (55)
#2-37	DYYMS	(1)	YITSSSYTNYADSVKG (2)	DRAVRGVIIIRPPDY (3)
#4-1	SYAMS	(56)	AITGSGGTYYADSVKG (57)	GGYTSGNSYFDY (58)
#4-7	TFYIH	(59)	FINPSGVNTNYAQKFQD (60)	DTRGWSLNLVDV (61)
#4-28	DYAMH	(62)	LINGDGGQTHYADSVKG (63)	GKRSPTYNGLEY (64)
#4-36	DYYMS	(65)	FISSSSGYTDYADSVKG (66)	RSSGFPPDL (67)
#4-43	SNYMS	(68)	VIYSGGSTYYADSVKG (69)	GRWSYDY (70)
#4-44	DYYMS	(71)	YISSSSSYTNYADSVKG (72)	TLYGSGSGDAFDI (73)
#4-45	DYGMS	(74)	GINWNGGSTGYADSVKG (75)	AVATDAFDI (76)
#4-52	SYWMH	(77)	RINS DGSSTSYADSVKG (78)	DLSPGSGSPFDY (79)
#4-54	TSGVGVG	(80)	FIYWND DKRYSPSLKS (81)	REIAAGLYAFDI (82)
#4-56	DYAMH	(83)	LISGDGGSTYYADSVKG (84)	GSYDSSGYYPGAFDI (85)
#4-62	DYGMS	(86)	GINWNGGSTGYADSVKG (87)	GPTIAGYYYGMDV (88)
#4-64	NYAMH	(89)	VISFDGRSKYYADSVRG (90)	EIGASYGSGGTPGY (91)
#4-65	SYYWS	(92)	RIYTSGSTNYNPSLKS (93)	DLAARNWFDV (94)
#4-68	SYAMS	(95)	AISGSGGSTYYADSVKG (96)	NLPAPGYCSSTSCYALYYYYGMDV (97)

クローン 番号	軽鎖 (L鎖)		
	CDR1 (配列番号)	CDR2 (配列番号)	CDR3 (配列番号)
#2-4	SGSSSNIGNNYVS (10)	DNNKRPS (11)	GTWDSSLSAGV (12)
#2-6	TGTSSDIGAYDFVS (98)	DVRNRPS (99)	SSFTTSSVWV (100)
#2-7	TGTSSDVGGNYVS (101)	EVSKRPS (102)	SSYAGSNMGV (103)
#2-16	未決定	未決定	未決定
#2-37	TGTSSDVGGNYVS (4)	DVSNRPS (5)	SSYTSSSTLV (6)
#4-1	KSSQSVLYSSNNKDYFA (142)	WASTRES (104)	QQYYRFPLT (105)
#4-7	SGRSSNIESNNVN (106)	SNNQRPS (107)	AAWDDSLSGQV (108)
#4-28	KSSQSVLYSSNNKKNYLA (109)	WASTRES (110)	QQYYSTPLT (111)
#4-36	未決定	未決定	未決定
#4-43	SGSSSNIGNNYVS (112)	DNNKRPS (113)	GTWDSSLSAGV (114)
#4-44	SGDKLGDKYAC (115)	QDSKRPS (116)	QAWDSSTYV (117)
#4-45	GGNNIGSKNVH (118)	RDSNRPS (119)	QVWDSSTACGV (120)
#4-52	QGDSLRSYYAS (121)	GKNNRPS (122)	NSRDSSGNHLV (123)
#4-54	TGTSSDVGGNYVS (124)	EVTKRPS (125)	CSYAGSYTFL (126)
#4-56	RASQSISSWLA (127)	KASSLES (128)	QQYNSYPYT (129)
#4-62	TGTSSDVGGNYVS (130)	EVSKRPS (131)	SSYAGSNNLYV (132)
#4-64	RASQSVSRYL (133)	DASNRAT (134)	QQRSHWQPLT (135)
#4-65	SGSSSNIGNNYVS (136)	DNNKRPS (137)	GTWDSSLSAYV (138)
#4-68	RASQSISSYLN (139)	AASSLQS (140)	QQSYSTPLT (141)

なお、表5および表6に、#2-4および#2-6のクローンのH鎖およびL鎖可変領域のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列をそれぞれ示し、表7に#2-4および#2-6のクローンのCDRのヌクレオチド配列を示す。

5

表5

クローン番号	H鎖可変領域アミノ酸配列	L鎖可変領域アミノ酸配列
#2-4	配列番号15	配列番号16
#2-6	配列番号143	配列番号144

表6

クローン番号	H鎖可変領域ヌクレオチド配列	L鎖可変領域ヌクレオチド配列
#2-4	配列番号31	配列番号32
#2-6	配列番号145	配列番号146

表 7

クローン番号	重 鎖 (H 鎖)		
	CDR1	CDR2	CDR3
#2-4	配列番号 2 3	配列番号 2 4	配列番号 2 5
#2-6	配列番号 1 4 7	配列番号 1 4 8	配列番号 1 4 9
クローン番号	軽 鎖 (L 鎖)		
	CDR1	CDR2	CDR3
#2-4	配列番号 2 6	配列番号 2 7	配列番号 2 8
#2-6	配列番号 1 5 0	配列番号 1 5 1	配列番号 1 5 2

実施例 9 遺伝子組替えによるヒト抗体の生産

(1) 組換えヒトIgG発現プラスミドの構築

- 5 データベース情報を参考にヒトIgG重鎖遺伝子の翻訳開始コドンのATGを含むようなセンスプライマーおよび翻訳中止コドンを含むアンチセンスプライマーを作製し、Human Spleen 5' - Stretch cDNA Library (クローンテック社製) を鋳型としてPCRを行う。増幅したDNA断片をヒトIgG遺伝子をpT7Blue (Novagen) に組み込み塩基配列を確認する。ヒトIgG遺伝子の内部
- 10 を切断しない適切な制限酵素によりヒトIgG遺伝子をpT7Blueから切り出した後、発現プラスミドであるpCAGGSのクローニング部位に挿入し、ヒトIgG重鎖発現プラスミドの構築を行う。なお、ヒトIgG軽鎖発現プラスミドの構築も重鎖の場合と同様の方法で行う。

(2) 抗体遺伝子のクローニング

- 15 ハイブリドーマ#2-6を培養し、細胞を調製する。得られた細胞をD-PBS (Sigma) で洗浄後、total RNAをTRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて単離精製する。次にOligo-dTプライマーとSuperScriptII system (Invitrogen) を用いて一本鎖cDNAを合成する。重鎖および軽鎖可変領域を増幅させるPCRプライマーを合成し、ハイブリドーマ由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行う。増幅したDNA断片をpT7Blue (Novagen) に組み込み塩基配列の確認を行う。
- 20

(3) ヒト-ヒトキメラ抗体発現プラスミドの構築

ヒトIgG遺伝子の重鎖可変領域を切り出すことができる適当な制限酵素を用いて重鎖可変領域を切り出し、ハイブリドーマ由来重鎖可変領域と置き換える。こ

の時、ハイブリドーマ由来重鎖可変領域のDNA断片は、挿入する制限酵素切断部位と同じ配列を含むプライマーによりPCRで増幅させる。ハイブリドーマ由来軽鎖可変領域を有する組換えヒトIgG発現プラスミドの構築も重鎖の場合と同様の方法で行う。

5 (4) ヒト-ヒトキメラ抗体産生クローンの選択

CHO (CCL-61) 又はSP2/0-ag14 (ATCC CRL1581) に導入し、培養後上清に産生される目的抗体をGPVIに対する結合活性により選択する。具体的には、先ず、キメラ抗体重鎖発現プラスミド、軽鎖発現プラスミド、pSV2-neoをそれぞれ4 μ g (計12 μ g) とトランスフェクション試薬であるFuGENE6 (ロシュ・ダイアグノステ

10 イクス) 60 μ Lを混合し、しばらく清置する。次に培養面積150cm²の培養用フラスコにおいてセミコンフルエントの状態まで培養した細胞の培養液中にプラスミドとFuGENEの混合液を添加する。2、3日の培養後、細胞を96wellマイクロプレートに0.7個/wellとなるように播種し、0.2 mg/ml G-418を含む培地にてさらに2、3週間の培養を行う。コロニーが形成されたwellから培養上清を回収し、EI

15 AにてGPVIとの結合活性を調べ、結合活性を有するクローンを得る。

(5) ヒト-ヒトキメラ抗体の産生

ヒト-ヒトキメラ抗体産生クローンを血清入りの培地で培養し、コンフルエントになった段階で無血清培地 (Hybridoma-SFM, Invitro

20 ec) と交換した後、さらに2日間の培養を行う。得られた培養上清をプロテインAカラム (Prosep-A、ミリポア) で精製し、精製キメラ抗体を得る。

実施例10 ハイブリドーマ由来抗GPVI抗体のIgG4化およびFab化の作製

(1) 材料および装置

用いた材料および装置を以下に示した。

25 ・プライマー (SIGMA Genosys Japan にて合成)

HV3-11-a	5'	GGAGTTTCCATTCGGTGATCAG	3'	(配列番号 153)
IGLV2-14-a	5'	GTGCTGGGGTCTCAGGAGGCAG	3'	(配列番号 154)
IgL-a	5'	CTATGAACATTCTGTAGGGGC	3'	(配列番号 155)
IgL-b	5'	TGCAGCTCTAGTCTCCCGTGG	3'	(配列番号 156)
30 IgM-l	5'	GGGAAGGAAGTCCTGTGCGA	3'	(配列番号 157)

39

	IGLV1-51-a	5'	CAGCTGTGAGCGCAGAAGGCAG	3'	(配列番号 158)
	IGLV1-51-b	5'	TCGGGACAATCTTCATCATG	3'	(配列番号 159)
	IgG4-a	5'	CGGTCACATGGCACCACCTCT	3'	(配列番号 160)
	IgG4-c	5'	TGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC	3'	(配列番号 161)
5	IgG4-d	5'	GACCATATTTGGACTCAACTCTCTTGTCCA	3'	(配列番号 162)
	IgG4-f	5'	GCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGG	3'	(配列番号 163)
	IgG4-g	5'	CCAGGAACTCAGGTGCTGGGCATGATGGGC	3'	(配列番号 164)
	IgG4-h	5'	TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC	3'	(配列番号 165)
	IgG4-i	5'	GCTCTCGGGGCTGCCCTTTGGCTTTGGAGA	3'	(配列番号 166)
10	IgG4-j	5'	CCCTGGCACTCATTTACCCAG	3'	(配列番号 167)
	IgG4-k	5'	GACGGGGTACGTGCCAAGCATCCT	3'	(配列番号 168)
	IgG4-m	5'	AGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTC	3'	(配列番号 169)
	IgG4-n	5'	AGATCTTCATGGGGACCATATTTGGACTC	3'	(配列番号 170)
	IgG4-t	5'	TTAATGATGATGATGATGATGTGGGGGACC	3'	(配列番号 171)
15	M4	5'	GTTTTCCCAGTCACGACG	3'	(配列番号 172)
	HchainREV-ScaI	5'	GGGCGGAGTACTGGAGACGGTGACC	3'	(配列番号 173)
	HchainEco47NheI	5'	CCCCCGCTAGCGCTGGAGACGGTGACC	3'	(配列番号 174)
	mIgG2c-a	5'	GGATCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTAT	3'	(配列番号 175)
	mIgG2c-b	5'	TGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGTGCCCA	3'	(配列番号 176)
20	mIgG2c-c	5'	TGGGCACTCTGGGCTCAATTTTCTTGTCCA	3'	(配列番号 177)
	mIgG2c-d	5'	GTCCCCCATGCGCAGCTCCAGACCTCTTGG	3'	(配列番号 178)
	mIgG2c-e	5'	CCAAGAGGTCTGGAGCTGCGCATGGGGGAC	3'	(配列番号 179)
	mIgG2c-f	5'	TCTCAAACCCAGAGGGCCAGTAAGAGCTC	3'	(配列番号 180)
	mIgG2c-g	5'	GAGCTCTTACTGGCCCTCTGGGTTTTGAGA	3'	(配列番号 181)
25	mIgG2c-h	5'	AGATCTTCATTTACCCAGAGACCGGGAGAT	3'	(配列番号 182)

・PCR 反応用酵素

Ex Taq (TAKARA BIO INC.)

10X 反応バッファーおよび dNTP mixture は付属のものを使用

- ・ゲノム DNA
 - HeLa genome lot. N34707-1 (BD Biosciences Clontech)
 - マウス ゲノム DNA (B6 マウス尾部より抽出)
- ・PCR 装置
 - 5 DNA Engine (MJ RESEARCH, INC.)
 - ・アガロースゲル電気泳動
 - SeaKem GTG Agarose (TAKARA BIO INC.)
 - サブマリン型電気泳動装置 (ADVANCE)
 - 50X TAE (2mol/L Tris-acetate, 0.05mol/L EDTA) (NIPPON GENE)
 - 10 分子量マーカー (*Sty* I 消化 DNA 断片)
 - ・ゲルからの DNA 断片抽出キット
 - QIAEX II (QIAGEN K. K.)
 - ・哺乳細胞用発現ベクター
 - pEF2cew (pEF-BOS の EF プロモーター上流に、CMV エンハンサーを付加した改良型発現ベクター)
 - 15
 - ・TA クローニング用ベクター及びライゲーション用試薬
 - pT7BlueT (NOVAGEN)
 - TaKaRa Ligation Kit ver. 2 (TAKARA BIO INC.)
 - ・*E. coli* Competent cell JM109 (TAKARA BIO INC.)
 - 20
 - ・プラスミド精製キット (QIAGEN K. K.)
 - ・シーケンス用キットおよび解析装置
 - DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit lot. 1767 (Amersham Biosciences)
 - ABI3100 genetic analyzer (Applied Biosystems)
 - 25
 - ・培養液
 - ダルベッコ MEM 培地 (Sigma)
 - ・トランスフェクション用試薬
 - FuGENE6 (ロシュダイアグノスティックス)

(2) 実験方法

用いた主な実験方法を以下に示した。

・PCR 反応

酵素付属の取り扱い説明書に従って行った。以下に、反応液の組成例を示した。

5 反応液

	TaKaRa Ex Taq (5units/ μ L)	0.25 μ L
	10X Ex Taq Buffer	5 μ L
	dNTP Mixture (2.5mM each)	4 μ L
	human kidney first strand cDNA	1 μ L
10	sense primer (10pmol/ μ L)	1 μ L
	anti-sense primer (10pmol/ μ L)	1 μ L
	H ₂ O	37.75 μ L

(a) アガロースゲル電気泳動

- 15 まず、0.8%濃度のアガロースゲルを作製した。これを 1x TAE を満たした泳動層に置き、ウェルにサンプル 5 μ L をアプライ後、135V で 15 分間泳動を行った。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、さらに UV 照射することでバンドを検出した。尚、分子量マーカーを同時に泳動した。

(b) ゲルからの DNA 断片抽出

- 20 目的とするバンドを剃刀で切り出し、QIAEX II キットを用いてゲル片から抽出を行った。方法は付属の取扱説明書に従った。抽出された DNA 断片は 20 μ L の滅菌水に溶解した。

(c) ライゲーション反応

- 25 抽出を終えた DNA 断片 1 μ L とクローニング用ベクターの pT7BlueT を 1 μ L、および ligation kit ver.2 の I 液 2 μ L を混和し、室温で 15 分間静置することで行った。

(d) 大腸菌への形質転換

コンピテント大腸菌 50 μ L を氷上で融解し、ライゲーション反応産物 4 μ L を加え、そのまま氷上に 30 分間静置した。42℃で 45 秒間熱ショックを与え、終濃度 50 μ g/mL アンピシリン含有 LB プレート上に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。

(e) プラスミドの精製およびシーケンス反応

それぞれキットの取り扱い説明書に従って行った。

(f) トランスフェクション

FuGENE6 の取り扱い説明書に従って行った。6 穴プレートの場合、トランスフェク
5 ション前日に COS-1 細胞を 1.5×10^5 cells/mL の密度で各ウェルに 2mL 植え込んでお
く。翌日、97 μ L のダルベッコ MEM 培地に 3 μ L の FuGENE6 と 1 μ g の発現プラスミド
を混和し 15 分以上静置した後、2mL の無血清ダルベッコ MEM 培地に滴下し、この培養
液と交換することで、トランスフェクションを行った。

10 (3) 重鎖可変領域および軽鎖をコードする遺伝子のクローニング

1) 各ハイブリドーマから抽出した全 RNA を、オリゴ dT プライマーを用いた逆
転写反応により、一本鎖 cDNA を合成した。次に、以下に示す各反応により、各
重鎖可変領域および軽鎖をコードする遺伝子断片をそれぞれ増幅した。

a) #2-4 一本鎖 cDNA を鋳型とし、プライマー (HV3-11-a および IgM-1)
15 を用いた PCR 反応で重鎖可変領域の cDNA を特異的に増幅した。一方、プライマ
ー (IGLV1-51-a および IgL-b) を用いた 1 回目の PCR 反応を行い、次にその反応
産物を鋳型とし、プライマー (IGLV1-51-b および IgL-a) を用いた 2 回目の PCR
反応 (nested-PCR) を行うことにより、軽鎖 cDNA を増幅した。

b) #2-6 一本鎖 cDNA を鋳型とし、プライマー (HV3-11-a および IgM-1)
20 を用いた PCR 反応で重鎖可変領域の cDNA を特異的に増幅した。同様に、プライ
マー (IGLV2-14-a および IgL-b) を用いた PCR 反応を行い、軽鎖 cDNA を増幅し
た。

2) 各増幅断片を pT7-BlueT ベクターにクローニングし、配列を確認した。#2-4
の重鎖可変領域を有するプラスミドを pT7-#2-4H、軽鎖を有するものを pT7-#2-4
25 λ とし、#2-6 も同様に、それぞれ pT7-#2-6H、pT7-#2-6 λ とした。

(4) 重鎖定常領域 (C γ 4) をコードする遺伝子のクローニング

HeLa ゲノム DNA を鋳型とし、以下のプライマー対で PCR 反応を行った。その結
果、IgG4-a および IgG4-d では CH1 ドメイン、IgG4-c および IgG4-g ではヒンジ
30 部分、IgG4-f および IgG4-i では CH2 ドメイン、IgG4-h および IgG4-k では CH3

ドメインというように、各ドメインをコードする遺伝子領域が増幅された。次に、これら4種の増幅産物を混合し、プライマーIgG4-m および IgG4-j を用いた PCR 反応を行うことで、各ドメインが連結された増幅産物を得た。この増幅産物を pT7-BlueT ベクターにクローニングし、重鎖定常領域 (C γ 4) をコードする配列であることを確認し、pTK-2232 とした。

(5) 抗体発現用の重鎖発現プラスミドの構築

pT7-#2-4H および pT7-#2-6H の重鎖可変領域をコードする遺伝子領域を、プライマー (M4 および HchainREV-ScaI) を用いた PCR 反応で増幅した後、その増幅産物を制限酵素 *EcoR* I および *Sca* I で切断することで、断片 A を調製した。

一方、pTK-2232 を制限酵素 *Eco* 47III および *Bam* HI で切断し、重鎖定常領域 (C γ 4) をコードする遺伝子断片 B を調製した。

これらの断片を、*EcoR* I および *Bam* HI で切断して調製した発現ベクター pEF2cew の EF プロモーター下流に、断片 A+断片 B となるように連結し、各重鎖発現プラスミドを構築した。配列を確認後、pTK-#2-4 γ および pTK-#2-6 γ とした。

(6) Fab 発現用の重鎖発現プラスミドの構築

①Fab 重鎖のみを発現するプラスミドの構築

pT7-#2-4H および pT7-#2-6H の重鎖可変領域をコードする遺伝子領域を、プライマー (M4 および HchainEco47NheI) を用いた PCR 反応で増幅した後、その増幅産物を制限酵素 *EcoR* I および *Nhe* I で切断することで、断片 C を調製した。

一方、pTK-2232 を鋳型とし、プライマー (IgG4-m および IgG4-n) を用いた PCR 反応を行い、CH1 ドメインの直後に停止コドンを含む CH1 遺伝子断片を増幅した。この CH1 増幅断片を pT7-BlueT ベクターにクローニングし、pT7-IgG4mn を構築した。この pT7-IgG4mn を制限酵素 *Nhe* I および *Bgl* II で切断し、断片 D を調製した。

これらの断片を、*EcoR* I および *Bam* HI で切断して調製した発現ベクター pEF2cew の EF プロモーター下流に、断片 C+断片 D となるように連結し、各 Fab

重鎖のみを発現するプラスミドを構築した。配列を確認後、pTK-#2-4Fab および pTK-#2-6Fab とした。

②C 末端にヒスチジントグ (His-tag) を有する Fab 重鎖 (Fab-His) を発現するプラスミドの構築

- 5 pTK-2232 を鋳型とし、プライマー (IgG4-m および IgG4-t) を用いて PCR 反応を行い、CH1 ドメインの直後に His-tag を有する CH1 遺伝子断片を増幅した。この CH1 増幅断片を pT7-BlueT ベクターにクローニングし、pT7-IgG4mt を構築した。この pT7-IgG4mt を制限酵素 *Nhe* I および *Bam* HI で切断し、断片 E を調製した。
- 10 これらの断片を、*Eco*R I および *Bam* HI で切断して調製した発現ベクター pEF2cew の EF プロモーター下流に、断片 C+断片 E となるように連結し、C 末端に His-tag を有する Fab 重鎖を発現するプラスミドを構築した。配列を確認後、pTK-#2-4Fab-His および pTK-#2-6 Fab-His とした。

15 (7) 軽鎖発現プラスミドの構築

各軽鎖遺伝子を有するプラスミド (pT7-#2-4 λ および pT7-#2-6 λ) を、軽鎖部分を切断しない適当な制限酵素 (例えば *Eco* RI および *Xba* I 等) で切り出し、断片 F を調製した。

- この断片 F を同じ制限酵素で切断して調製した発現ベクター pEF2cew の EF プロモーター下流に連結し、各軽鎖発現プラスミドを構築した。配列を確認後、pTK-#2-4 λ および pTK-#2-6 λ とした。
- 20

(8) 組換え抗体および Fab の発現

- 1) COS-1 細胞は 10% 胎仔ウシ血清入りのダルベッコ MEM 培地で継代し、トランスフェクション前日に、 1.5×10^5 cells/mL の密度で培養容器に植え込んだ。翌日、重鎖 (あるいは Fab) 発現プラスミドおよび軽鎖発現プラスミドをトランスフェクション試薬 (FuGENE6、ロシュダイアグノスティックス) と適当量混和した後に、無血清のダルベッコ MEM 培地に滴下し、これを培養液と交換することで、コトランスフェクションを行った。
- 25

その結果、pTK-#2-4 γ および pTK-#2-4 λ をコトランスフェクションした場合には、組換え IgG4 抗体である R#2-4 抗体を培養液中に分泌発現させることができた。同様に、pTK-#2-6 γ および pTK-#2-6 λ を用いることで R#2-6 抗体を、pTK-#2-4Fab および pTK-#2-4 λ 、あるいは pTK-#2-6Fab および pTK-#2-6 λ を用いることで、組換え Fab (R#2-4Fab および R#2-6Fab) を、pTK-#2-4Fab-His および pTK-#2-4 λ 、あるいは pTK-#2-6Fab-His および pTK-#2-6 λ を用いることで、His-tag を有する組換え Fab (R#2-4Fab-His および R#2-6Fab-His) を培養液中に分泌発現させることができた。

2) 5% CO₂存在下、37℃で2～3日間培養し、培養液を回収した。

10 (9) 組換え抗体の精製

【組換え IgG 抗体の精製】

培養液からの、組換え IgG4 抗体 (R#2-4 抗体および R#2-6 抗体) の精製は、Prosep-A カラム (MILLIPORE) を用いて行い、PBS (pH 7.4) で透析後、280nm の吸光度より濃度を算出した。

15 【組換え Fab の精製】

1) 培養液からの、組換え Fab 分子 (R#2-4Fab および R#2-6Fab) の精製は、抗ヒト lambda 軽鎖抗体カラム (自家作製) を用いて行った。

2) 培養液からの、His-tag を有する組換え Fab 分子 (R#2-4Fab-His および R#2-6Fab-His) の精製は、先ず Hi-Trap Chelating HP (Amersham) を用いて 1 回目の精製を行った後、抗ヒト lambda 軽鎖抗体カラムを用いて 2 回目の精製を行うことで達成した。

3) 全ての Fab は精製後、PBS (pH 7.4) で透析し、280nm の吸光度より濃度を算出した。尚、血小板凝集阻害実験に使う Fab は生理食塩水で透析した。

25 実施例 1 1 ヒト GPVI - マウス Fc 融合蛋白質の作製

(1) GPVI-mFc 融合蛋白発現プラスミドの構築

1) マウスゲノム DNA を鋳型とし、以下のプライマー対で PCR 反応を行った。その結果、mIgG2c-a および mIgG2c-c では CH1 ドメイン、mIgG2c-b および mIgG2c-e ではヒンジ部分、mIgG2c-d および mIgG2c-g では CH2 ドメイン、mIgG2c-f およ

び mIgG2c-h では CH3 ドメインというように、マウスイムノグロブリン (mIgG2c) 重鎖定常領域の各ドメインをコードする遺伝子領域が増幅された。次に、これら 4 種の増幅産物を混合し、プライマー mIgG2c-a および mIgG2c-h を用いた PCR 反応を行うことで、各ドメインが連結された増幅産物を得た。この増幅
5 産物を pT7-BlueT ベクターにクローニングし、重鎖定常領域 (C γ 2c) をコードする配列であることを確認し、pT7-mIgG2c とした。

2) この pT7-mIgG2c からマウス Fc 領域をコードする遺伝子断片を制限酵素 *Bam* HI および *Kpn* I で切り出し、断片 H を調製した。一方、pCAGGS-GPVI-Fc プラスミドから、ヒト GPVI の細胞外ドメインをコードする遺伝子断片を制限酵素 *Xba* I
10 I および *Bgl* II で切り出し、断片 I を調製した。これらの断片を、*Xba* I および *Kpn* I で切断して調製した発現ベクター pEF2cew の EF プロモーター下流に、断片 H+断片 I となるように連結し、ヒト GPVI とマウス Fc 融合蛋白 (GPVI-mFc) を発現するプラスミドを構築した。配列を確認後、pTK-2249 とした。

(2) GPVI-mFc 融合蛋白質の発現および精製

15 1) COS-1 細胞は 10% 胎仔ウシ血清入りのダルベッコ MEM 培地で継代し、トランスフェクション前日に、 1.5×10^5 cells/mL の密度で培養容器に植え込んだ。翌日、pTK-2249 をトランスフェクション試薬 (FuGENE6、ロシュダイアグノスティックス) と適当量混和した後に、無血清のダルベッコ MEM 培地に滴下し、これを培養液と交換することで、トランスフェクションを行った。

20 2) 5% CO₂ 存在下、37℃で 2～3 日間培養し、培養液を回収した。

3) 培養液からの、GPVI-mFc 融合蛋白質の精製は、Prosep-A カラム (MILLIPORE) を用いて行い、PBS (pH 7.4) で透析後、280nm の吸光度より濃度を算出した。

実施例 12 各種抗 GPVI 抗体の GPVI 結合活性の測定 (Cell cytometry)

25 健常人より採血した血液から遠心分離により血小板分画を調製した。 5×10^6 の血小板を 5% ヒト血漿、0.5% 非働化胎仔ウシ血清 (FBS) 含有 PBS-、50 μ L に懸濁し、実施例 10 で作製した各種組換え抗 GPVI ヒト抗体 (IgG4) 2 μ g を添加後、室温 1 時間インキュベートした。0.5% 非働化 FBS 含有 PBS-、1 mL で 2 回洗浄後、0.5% 非働化 FBS 含有 PBS-、50 μ L に再懸濁し、1 μ g の抗ヒト

IgG 抗体、FITC 標識抗体を加えた後、室温 1 時間インキュベーションした。
0.5%非働化 FBS 含有 PBS-、1mL で 2 回洗浄後、Cytometric FC500 (ベックマンコールター) で FITC 陽性血小板数を測定した。

この結果、R#2-6 抗体を反応させた血小板は 90%以上が、また R#2-4 抗体では 68%が FITC 陽性細胞であった。

5 なお、図 4 は、ヒト末梢血より調製した血小板に組換え抗 GPVI ヒト抗体 (R#2-4 および R#2-6) が結合することを示す図である。図 4 中、白抜きのヒストグラムは陰性対照としたヒト全 IgG を反応させた際の蛍光強度分布を示す。灰色で示したヒストグラムは R#2-4 あるいは R#2-6 抗体を反応させた際の蛍光強度分布を示す。

実施例 1 3 各種抗 GPVI 抗体の GPVI 結合活性測定(ELISA 法)

GPVI-hFc キメラタンパク質あるいは GPVI-mFc キメラタンパク質を PBS-で 3 μ g/mL に調製し、ELISA 用 96well プレートに 50 μ L/well ずつ添加し、37℃、
15 2 時間インキュベーションすることにより固相化した。400 μ L/well の PBS-で 5 回洗浄した後、2%スタビリガード/PBS-で室温 1 時間ブロッキング処理した。
実施例 1 0 で調製した各種組換え抗 GPVI ヒト抗体 (I g G 4) を GPVI-Fc 固相化プレートに 10 μ g/mL の濃度で添加し、室温 2 時間反応させた。
0.05%Tween20 含有 PBS-で 3 回、PBS-で 2 回洗浄したのち、二次抗体(抗ヒト
20 κ -軽鎖抗体 HRP 標識あるいは抗ヒト λ -軽鎖抗体 HRP 標識)をそれぞれ PBS-で 1000 倍希釈、2000 倍希釈し、各 well に添加、室温 2 時間インキュベーションした。0.05%Tween20 含有 PBS-で 3 回、PBS-で 2 回洗浄したのち、TMB 溶液を添加し、室温 20 分発色させ、1 M 硫酸を加え発色を停止させて、450nm の吸光度を測定した。

25 この結果、陰性対照としたヒト全 IgG では GPVI-hFc とほとんど結合しないが、R#2-4 および R#2-6 抗体は 10 μ g/mL で GPVI-hFc に対して著明な結合活性を示した (図 5)。また、R#2-6 および R#2-4 抗体は GPVI-mFc にも親和性を示した。

実施例 1 4 全血及び血小板に及ぼす抗 GPVI 抗体単独の影響**(1) 全血を用いた血餅形成における抗 GPVI 抗体の影響**

健康人より抗トロンビン剤を用いて採血した血液、2 mL に各種 GPVI 抗体を最終濃度 $30 \mu\text{g/mL}$ になるように添加し、 37°C で 3 時間インキュベーションした。その後、目視により血餅形成を確認した。既知の抗 GPVI 抗体、例えば、自己免疫性血小板減少患者血中由来 IgG は単独で血小板凝集を惹起するため（非特許文献 2）、この系では凝固系が過度に活性化され血餅形成を引き起こすと考えられるが、コントロール IgG 添加の場合と同様に、R#2-4 及び R#2-6 抗体添加のいずれにおいても血餅形成は全く認められなかった。

(2) 血小板に及ぼす抗 GPVI 抗体の影響

実施例 6 に準じて、PRP を用いて、抗体単独での血小板凝集惹起作用を測定した。その結果、 $100 \mu\text{g/mL}$ の濃度においても R#2-4 及び R#2-6 抗体は単独ではヒト血小板凝集を惹起しなかった。

実施例 1 5 ヒト IgG 化抗 GPVI 抗体による血小板のコラーゲン応答性に及ぼす効果

健康人より抗トロンビン剤用いて採血した血液、2 mL に各種 GPVI 抗体を添加し、 37°C で 3 時間インキュベーションした。その後、血小板を単離し、 3×10^8 platelets / mL に調製し、 CaCl_2 溶液を終濃度で 1 mM となるように添加し、 37°C で攪拌しながら 3 分間インキュベートした。コラーゲン溶液を終濃度で $1 \sim 2 \mu\text{g/mL}$ となるように加え、血小板凝集能測定装置（エー・シー・メディカル株式会社、MCM ヘマトレーサー 801）にて濁度を測定した。

この結果、 $30 \mu\text{g/mL}$ の R#2-6 または R#2-4 抗体で処理した血小板ではコラーゲンに対する血小板凝集能の顕著な低下が認められた。

表 8

	抗体濃度	最大凝集率
Control	—	70 %
R#2-4	$30 \mu\text{g/mL}$	10 %
R#2-6	$30 \mu\text{g/mL}$	2 %

産業上の利用可能性

本発明の抗体は、ヒト血小板上のGPVIと特異的に結合することにより血小板凝集能を低下させるので、例えば抗血小板薬等の医薬として用いることができる。

- 5 また、本発明のヒト抗体は、医薬としてヒトに投与しても異種抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体の持つ免疫原性がない点で有用である。本発明の抗体で単独でヒト血小板の凝集を惹起しないものは、例えばFabにする等の処理をせずにそのまま医薬として投与することができる。本発明の抗体は既存の抗体よりも低用量でコラーゲンによる血小板凝集を抑制することができ、より少ない用量で医薬として
- 10 有効である。

請求の範囲

1. ヒト血小板膜糖蛋白質 VI と特異的に結合し、単独ではヒト血小板凝集を惹起しないヒト抗体またはその活性断片。

5 2. ヒト血小板膜糖蛋白質 VI と特異的に結合し、生体内に投与することでコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制するヒト抗体またはその活性断片。

3. ヒト GPVI と特異的に結合し、血小板上の GPVI とコラーゲンとの結合を特異的に阻害する、血小板上の機能的な GPVI を消失させる、あるいは、予めヒト血小板と接触させることによりヒト血小板がコラーゲンに応答して凝集する能力を低下もしくは欠如させる、いずれか一つ以上の作用を持つヒト抗体またはその活性断片

10

4. ヒト血小板膜糖蛋白質 VI に特異的に結合し、コラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制するが、単独ではヒト血小板凝集を惹起しないヒト抗体またはその活性断片。

15 5. 配列番号 47 のアミノ酸配列を VH CDR1 に、配列番号 48 のアミノ酸配列を VH CDR2 に、配列番号 49 のアミノ酸配列を VHCDR3 に、配列番号 98 のアミノ酸配列を VLCDR1 に、配列番号 99 のアミノ酸配列を VLCDR2 に、配列番号 100 のアミノ酸配列を VLCDR3 に、それぞれ有する抗体もしくはその活性断片、または配列番号 7 のアミノ酸配列を VH CDR1 に、配列番号 8 のアミノ酸配列を VH

20 CDR2 に、配列番号 9 のアミノ酸配列を VHCDR3 に、配列番号 10 のアミノ酸配列を VLCDR1 に、配列番号 11 のアミノ酸配列を VLCDR2 に、配列番号 12 のアミノ酸配列を VLCDR3 に、それぞれ有する抗体もしくはその活性断片。

6. 請求項 1 ないし 5 の抗体またはその活性断片を産生する細胞。

7. 請求項 1 ないし 5 の抗体またはその活性断片の H鎖及び／または L鎖をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド

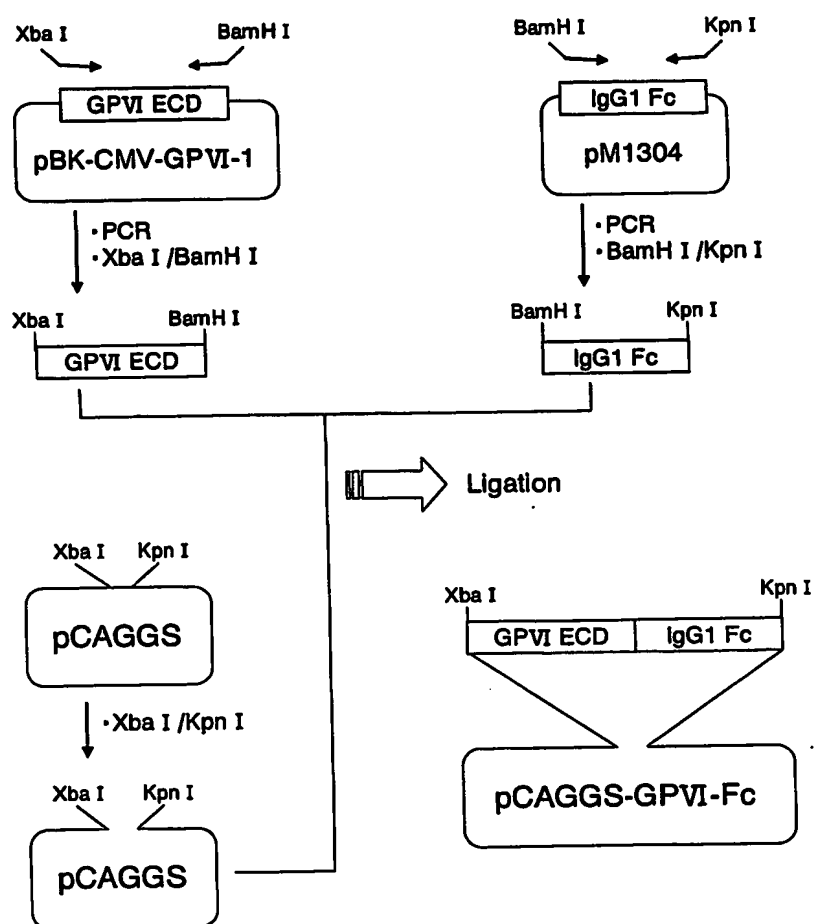
25

8. 請求項 1 ないし 4 の抗体またはその活性断片を有効成分として含有する医薬組成物。

9. 組換えヒト-ヒトキメラ抗体の製造方法。

図 1

pCAGGS-GPVI-Fc の構築



2/4

図 2

pYNG-GPVI-Fc の構築

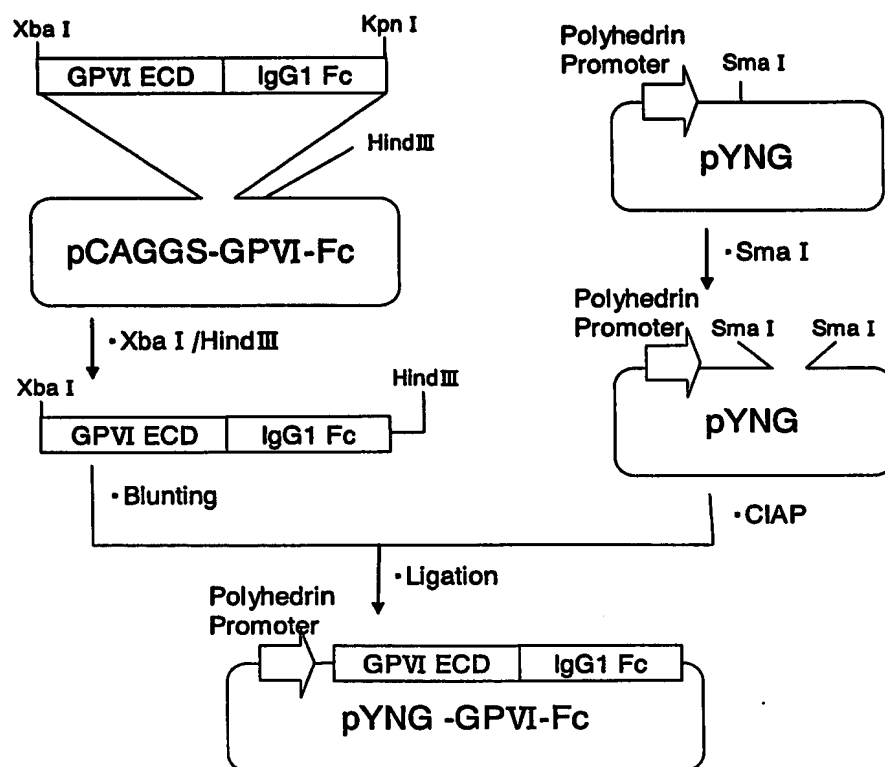


図 3

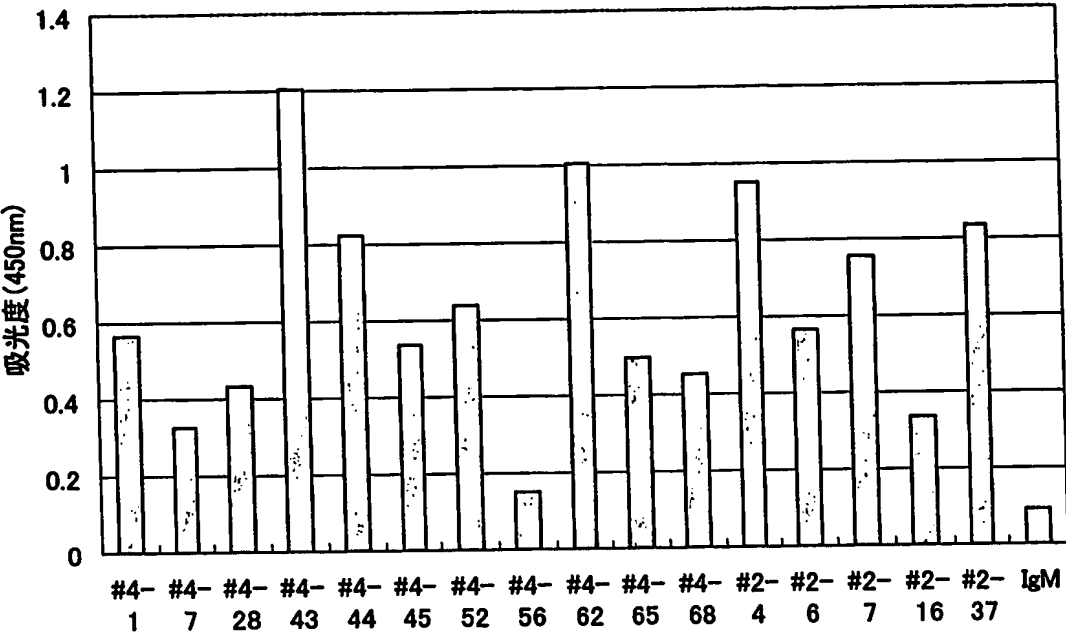


図 4

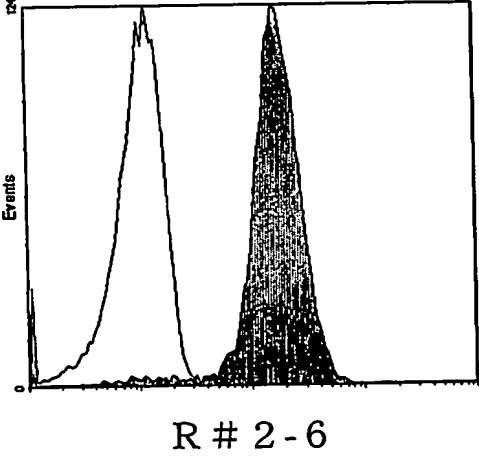
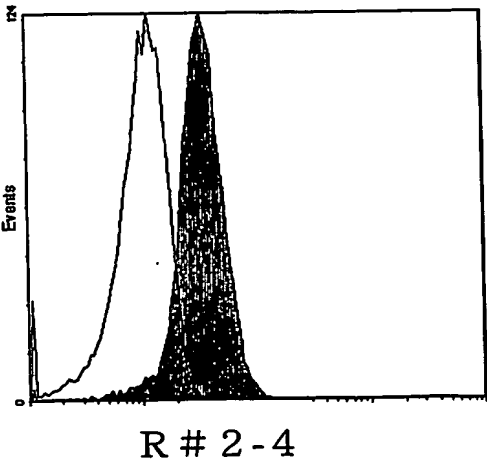
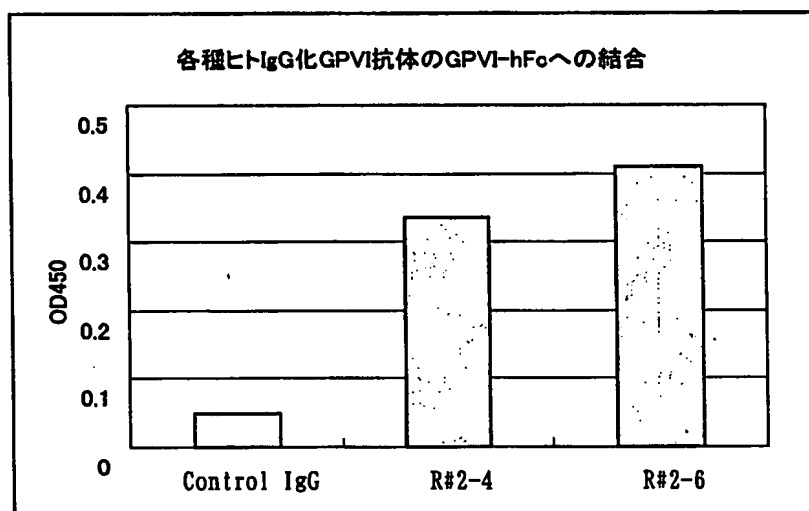


図 5



SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical, Co., Ltd.

<120> Human antiplatelet membrane glycoprotein monoclonal antibody

<130> P03-0096PCT

<150> JP 2003-199192

<151> 2003-07-18

<160> 182

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Arg Ala Val Arg Gly Val Ile Ile Ile Arg Pro Pro Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser .

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Val

1 - 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

His Phe Ile Leu Thr Gly Tyr His Tyr

1

5

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1

5

10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1

5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Gly Val

1

5

10

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Arg Ala Val Arg Gly Val Ile Ile Ile Arg Pro Pro Asp

100

105

110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1

5

10

15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20

25

30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35

40

45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125

<210> 15

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Asn His Phe Ile Leu Thr Gly Tyr His Tyr Trp Gly

115

120

125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130

135

<210> 16

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Thr Cys Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile His Cys Thr Gly

1 -

5

10

15

Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala

20

25

30

Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

35

40

45

Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro

50

55

60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp

65

70

75

80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr

85

90

95

Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp

100

105

110

Ser Ser Leu Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

	115	120	125
Leu			
<210>	17		
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	17		
gactactaca tgagc			15
<210>	18		
<211>	51		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	18		
tacattacta gtagtagtag ttacacaaac tacgcagact ctgtgaaggg c			51
<210>	19		
<211>	45		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	19		
gatcgagcgg ttcggggagt tattataatc cgcccgccag actac			45
<210>	20		
<211>	42		

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

actggaacca gcagtgacgt tgggtggttat aactatgtct cc 42

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gatgtcagta atcggccctc a 21

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

agctcatata caagcagcag cactctggta 30

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

agctatgcca tgagc 15

<210> 24

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

cacttttattt tgactggtta tcactac 27

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

tctggaagca gctccaacat tgggaataat tatgtatcc 39

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gacaataata agcgaccctc a 21

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ggaacatggg atagcagcct gaggctggg gtg 33

<210> 29

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactagta gtagtagtta cacaaactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcga 300
gcggttcggg gaggattat aatccgcccg ccagactact ggggccaggg aacctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 30

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

```
cagctctgcc tgactcagcc ggccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccacaggca aagcccccaa actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcaggggtt      180
tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacat ctcctggctc      240
caggtcaggg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cactctggta      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggtgcccc ctcggctact      360
ctgttccac cctcctct                                     378
```

<210> 31

<211> 412

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

```
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatct taaaagggtg ccagtgtgag      60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggctcct gagactctcc      120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca      180
gggaaggggc tggagtgggt ctcagctatt agtggtagtg gtggtagcac atactacgca      240
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa tcactttatt      360
ttgactgggt atcactactg gggccaggga accctgggtc ccgtctcctc ag      412
```

<210> 32

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

```
atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggccag      60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc    120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca    180
ggaacagccc ccaaactcct cttttatgac aataataagc gacctcagg gattcctgac    240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact    300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc tggggtgttc    360
ggcggaggga ccaagctgac cgiccta                                     387
```

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 33

```
gctctagagc atgtctccat ccccgaccgc c                                     31
```

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 34

cgggatccgt tgcccttggg gtagtactg

29

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 35

aaaggatcca gatctaacga gcccaaactt tg

32

<210> 36

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 36

aaaggtaccc tatcattttac ccggagacag ggag

34

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 37

gaggtgcagc tggaggagtc tgg

23

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 38

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc

24

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 39

gaggtgcagc tggaggagtc tgg

23

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 40

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc

24

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 41

cagtctgccc tgactcagcc ggc

23

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 42

agaggagggt gggaacagag tgac

24

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 43

cagtctgtct tgacgcagcc ggc

23

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 44

agaggagggt gggaacagag tgac

24

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 45

gttttcccag tcacgacgt

19

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 46

ctaatacgac tcactatagg

20

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asn Tyr Ala Met Ala

1

5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Ile Ser Val Ser Gly Thr Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Gly Leu Pro His Pro Lys Tyr Phe Cys Asp Ser

1 5 10

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Asn Tyr Met Ser

1 5

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Lys Ala Asp His Tyr Asp Ser Leu Ala Pro Asp Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Ser Tyr Asp Met His

1 5

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ala Gly Lys Met Trp Trp Arg Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ile Thr Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Gly Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Thr Phe Tyr Ile His

1 5

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Phe Ile Asn Pro Ser Gly Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Asp Thr Arg Gly Trp Ser Leu Asn Gly Leu Asp Val

1 5 10

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

-

<400> 63

Leu Ile Asn Gly Asp Gly Gly Gln Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Lys Arg Ser Gly Thr Tyr Tyr Asn Gly Leu Glu Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Phe Ile Ser Ser Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Arg Ser Ser Gly Phe Pro Phe Asp Leu

1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Ser Asn Tyr Met Ser

1 5

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Arg Trp Ser Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 - 5

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Asp Tyr Gly Met Ser

1

5

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Val Ala Thr Asp Ala Phe Asp Ile

1

5

<210> 77

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Tyr Trp Met His

1

5

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Asp Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ser Pro Phe Asp Tyr

1 - 5 10

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly

1 5

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Phe Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Arg Glu Ile Ala Ala Ala Gly Leu Tyr Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

-

<400> 85

Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Asp Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gly Pro Thr Ile Ala Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Asn Tyr Ala Met His

1 5

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Val Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Glu Ile Gly Ala Ser Tyr Tyr Gly Ser Gly Gly Thr Pro Gly Tyr

1 5 10 15

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 93

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Asp Leu Ala Ala Arg Pro Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 - 5 10 15

Gly

<210> 97

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Asn Leu Pro Ala Pro Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Ala Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210>	98
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 98

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ala Tyr Asp Phe Val Ser
1 5 10

<210>	99
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 99

Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser
1 5

$\langle 210 \rangle$	100
$\langle 211 \rangle$	10
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 100

Ser Ser Phe Thr Thr Ser Ser Val Trp Val

1 5 10

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Met Gly Val

1 5 10

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Ser Gly Arg Ser Ser Asn Ile Glu Ser Asn Asn Val Asn
1 5 10

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Gln Val
1 5 10

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Lys Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Gly Val

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys

1 5 10

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val

1 5

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His

1 . 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Cys Gly Val

1 5 10

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Gln.Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

〈213〉 Homo sapiens

<400> 123

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Leu Val

1 5 10

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Thr Phe Leu

1 5 10

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Leu Tyr Val
1 5 10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Gln Gln Arg Ser His Trp Gln Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 142

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Phe

1

5

10

15

Ala

<210> 143

<211> 140

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 143

Met Glu Phe Gly Leu Arg Trp Leu Phe Leu Val Ala Phe Leu Lys Gly

1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Val Ser Gly Thr Ser Thr Ala Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Gly Leu Pro His Pro Lys Tyr Phe Cys Asp
 115 120 125
 Ser Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 144

<211> 129

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 144

Met Ala Trp Ala Leu Leu Phe Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
 20 25 30

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile

35

40

45

Gly Ala Tyr Asp Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala

50

55

60

Pro Glu Leu Val Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser

65

70

75

80

Asn Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile

85

90

95

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe

100

105

110

Thr Thr Ser Ser Val Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

115

120

125

Leu

<210> 145

<211> 421

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 145

atggagtttg ggctgaggtg gctttttctt gtggcttttt taaaagggtg ccagtgcgag 60

gtacagctgt tggagtctgg gggagacttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttagtaac tatgccatgg cctgggtccg ccaggctcca 180

gggaaggggc tggagtgggt ctcagcaatt agtgtttagtg gtactagcac agcctacgca 240

gactccgtga agggccggtt caccgtctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtattta 300

caaatgaaca gcctgagagc cgacgacacg gccgtatatt actgtgcgaa aagagggcta 360

ccgcacccga aatacttctg tgactcctgg ggccaggga ccatgggtcac cgtctcctca 420

g

421

<210> 146

<211> 387

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 146

```
atggcctggg ctctgctatt cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag    60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctcctg gacagtcgat caccatctcc    120
tgcactggaa ccagcagtga cattggtgct tatgactttg tcicctggta ccaacaacac    180
ccaggcaaag cccccgaact cgtgatattat gatgtccgta atcggccctc aggggtttct    240
aatcgcttct ctgcctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccag    300
gctgaggacg aggctgattia ttactgcagc tcatttacia ccagcagcgt ttgggtgttc    360
ggcggaggga ccaagctgac cgtccta                                     387
```

<210> 147

<211> 15

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 147

```
aactatgcca tggcc                                             15
```

<210> 148

<211> 51

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 148

gcaattagtg ttagtggtac tagcacagcc tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 149

<211> 36

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 149

agagggctac cgcacccgaa atacttctgt gactcc 36

<210> 150

<211> 42

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 150

actggaacca gcagtgacat tggcgttat gactttgtct cc 42

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 151

gatgtccgta atcggccctc a 21

<210> 152

<211> 30

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 152

agctcattta caaccagcag cgtttgggtg

30

<210> 153

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 153

ggagtttcca ttcggtgatc ag

22

<210> 154

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 154

gtgctggggt ctcaggaggc ag

22

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 155

ctatgaacat tctgtagggg c

21

<210> 156

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 156

tgcagctcta gtctcccgtg g

21

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 157

gggaaggaag tcctgtgcga

20

<210> 158

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 158

cagctgtgag cgcagaaggc ag

22

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 159

tcgggacaat cttcatcatg

20

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 160

cggtcacatg gcaccacctc t

21

<210> 161

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 161

tggacaagag agttgagtc aaatatggtc

30

<210> 162

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 162

gaccatattt ggactcaact ctcttgcca

30

<210> 163

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 163

gcccatcatg cccagcacct gaggtcctgg

30

<210> 164

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 164

ccaggaactc aggtgctggg catgatgggc

30

<210> 165

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 165

tctccaaagc caaagggcag ccccgagagc

30

<210> 166

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 166

gctctcgggg ctgccctttg gctttggaga

30

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 167

ccctggcact catttaccca g

21

<210> 168

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 168

gacggggtac gtgccaagca tcct

24

<210> 169

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 169

agcgctagca ccaagggcc atccgtcttc

30

<210> 170

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 170

agatcttcat gggggacat atttgactc

30

<210> 171

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 171

ttaatgatga tgatgatgat gtgggggacc

30

<210> 172

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 172

gttttcccag tcacgacg

18

<210> 173

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 173

gggcggagta ctggagacgg tgacc

25

<210> 174

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 174

cccccgctag cgctggagac ggtgacc

27

<210> 175

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 175

ggatccaaaa caacagcccc atcgggtctat

30

<210> 176

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 176

tggaacaagaa aattgagccc agagtgccca

30

<210> 177

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 177

tgggcactct gggctcaatt ttcttgtcca

30

<210> 178

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 178

gtcccccatg cgcagctcca gacctcttgg

30

<210> 179

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 179

ccaagaggtc tggagctgcg catgggggac

30

<210> 180

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 180

tctcaaaacc cagagggccca gtaagagctc

30

<210> 181

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 181

gagctcttac tggccctctg ggttttgaga

30

<210> 182

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 182

agatcttcat ttacccagag accgggagat

30